

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



Regulación de la dinámica de las células B por estímulos de tipo innato: efectos de TLR4 y su ligando LPS.

Tesis doctoral

Memoria doctoral presentada por
Laura Barrio Cano
para optar al título de Doctor

Madrid, Septiembre de 2013

El trabajo presentado en esta memoria se realizó en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC, bajo la dirección de la Dra. Yolanda Rodríguez Carrasco

Esta tesis ha sido posible gracias a un contrato de Formación de Personal Investigador (FPI-MICINN, 2009), con el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)

ABREVIATURAS

AP-1	proteína activadora 1 (del inglés, <i>activator protein -1</i>)
ASC	célula secretora de anticuerpos (del inglés, <i>antibody secreting cells</i>)
BCAP	adaptador de PI3K en células B (del inglés, <i>B cell adaptor for PI3K</i>)
BCR	receptor de célula B (del inglés, <i>B cell receptor</i>)
BIRB	BIRB785, inhibidor de la activación de p38
BSA	albúmina de suero bovino (del inglés, <i>bovine serum albumin</i>)
CFSE	carboxifluorescein succimidil ester
CP	célula plasmática
CSR	cambio de clase de inmunoglobulina (del inglés, <i>class switching recombination</i>)
DIC	microscopía de contraste (del inglés, <i>differential interference contrast</i>)
DOCK2	del inglés, <i>dedicator of cytokinesis 2</i>
DOPC	fosfatidil colina (del inglés, <i>1,2-dioleoyl-fosfatidil-colina</i>)
ECM	matriz extracelular (del inglés, <i>extracellular matrix</i>)
ERK	proteína quinasa (del inglés, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ERM	Ezrina-Radixina-Moesina
FCS	suero bovino fetal (del inglés, <i>fetal calf serum</i>)
FDC	células foliculares dendríticas (del inglés, <i>follicular dendritic cells</i>)
FO	folicular/es
FRC	células fibroblásticas reticulares (del inglés, <i>fibroblastic reticular cell</i>)
GAP	proteína activadora de GTPasas (del inglés, <i>GTPase-activating proteins</i>)
GC	centro germinal (del inglés, <i>germinal center</i>)
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP (del inglés, <i>GDP dissociation inhibitors</i>)
GDP	guanosina 5'-difosfato (del inglés, <i>Guanosine 5'-DiPhosphate</i>)
GEF	factor intercambiador de nucleótidos de guanina (del inglés, <i>Guanine nucleotide Exchange factor</i>)
GFP	proteína verde fluorescente (del inglés, <i>green fluorescent protein</i>)
Gnai	del inglés, <i>Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha</i>
GPI	glicosil-fosfatidil inositol (del inglés, <i>glycosylphosphatidyl inositol</i>)
GTP	guanosina 5'-trifosfato (del inglés, <i>Guanosine 5'-TriPhosphate</i>)
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanolsulfónico
HEV	vénulas del endotelio alto (del inglés, <i>high endothelial venules</i>)
HRP	peroxidasa (del inglés, <i>horseradish peroxidase</i>)
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1 (del inglés, <i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IF	inmunofluorescencia
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina
IKK	quinasa de I κ B (del inglés, <i>IκB kinase</i>)

IL-1R	receptor de la Interleuquina-1 (del inglés, <i>interleukin 1 receptor</i>)
IRAK	quinasa asociada al receptor de interleuquina 1 (del inglés, <i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>)
IRF-3	factor de regulación de interferón 3 (del inglés, <i>interferon regulatory factor 3</i>)
IRM	del inglés, <i>interference reflection microscopy</i>
JNK	quinasa c-jun N-terminal (del inglés, <i>c-jun N-terminal kinases</i>)
LFA-1	del inglés, <i>lymphocyte function-associated antigen</i>
LPS	lipopolisacárido
MAPK	del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	proteína quinasa de ERK (del inglés, <i>mitogen-activated ERK kinase</i>)
MHC-II	complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (del inglés, <i>major histocompatibility complex II</i>)
MKK	del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLC	cadenas ligeras de la miosina (del inglés, <i>myosin light chains</i>)
MTOC	centro organizador de microtúbulos (del inglés, <i>microtubule-organizing center</i>)
MyD88	del inglés, <i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
MZ	zona marginal (del inglés, <i>marginal zone</i>)
NEMO	modulador esencial de NFkB (del inglés, <i>NFkB essential modulator</i>)
NFkB	del inglés, <i>nuclear factor-kappa B</i>
NM-II	proteína motora no-muscular miosina de tipo II (del inglés, <i>non-muscle myosin II</i>)
OLS	órganos linfoides secundarios
PAK	del inglés, <i>p21-activated kinases</i>
PALS	vaina linfática periarterial (del inglés, <i>periarteriolar lymphoid sheaths</i>)
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, <i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>)
PBS	tampón fosfato salino
PD	PD184352,
PDMS	polidimetilsiloxano
PFA	paraformaldehído
PI3K	fosfatidil-inositol 3 quinasa (del inglés, <i>phosphatidy-Inositol 3-kinase</i>)
PIP2	del inglés, <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PRR	del inglés, <i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	di-fluoruro de polivinilideno (del inglés, <i>polyvinylidene difluoride</i>)
Rgs	proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (del inglés, <i>regulators of G-protein signaling</i>)
RIP-1	del inglés, <i>receptor interacting protein 1</i>
ROCK	proteína quinasa asociada a Rho (del inglés, <i>Rho-associated protein kinase</i>)
RT	temperatura ambiente,(del inglés, <i>room temperature</i>)

SDS	dodecil sulfato sódico (del inglés, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SHM	hipermutación somática (del inglés, <i>somatic hypermutation</i>)
SNARF1	SNARF®-1 Carboxylic Acid, Acetate, Succinimidyl Ester
Syk	del inglés, <i>spleen tyrosin kinase</i>
TAK1	del inglés, <i>transforming growth factor-b-activated protein kinase 1</i>
TBK-1	del inglés, <i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS	tampón Tris-salino (del inglés, <i>Tris-buffered saline</i>)
TBS-T	TBS-Tween 20
TD	respuesta T-dependiente
TI	respuesta T-independiente
TIR	dominio Toll/IL-R
TIRAP	del inglés, <i>TIR-domain containing adaptor molecule</i>
TLR	receptores de tipo Toll (del inglés, <i>toll-like receptors</i>)
TRAF6	del inglés, <i>tumor-necrosis factor receptor associated factor 6</i>
TRAM	del inglés, <i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	del inglés, <i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β</i>
WASP	del inglés, <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE2	del inglés, <i>WASP-family verprolin homology protein</i>
WB	western-blot
WIP	del inglés, <i>WASP interacting protein</i>
WT	fenotipo salvaje (del inglés, <i>Wild type</i>)

INDICE

SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. LA CÉLULA B	17
1.1.1 TIPOS DE CÉLULA B	17
1.1.2 TIPOS DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LAS CÉLULAS B	18
1.1.2.1 Características generales de la respuesta adaptativa humoral de tipo T-D	18
1.1.2.2 El papel de las células b en la respuesta inmune de tipo innato	20
1.2. LOS RECEPTORES DE TIPO TOLL EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA	21
1.2.1 LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE TLR4	23
1.2.2.1 Ruta de señalización dependiente de myd88	23
1.2.2.2 Ruta de señalización dependiente de tríf	24
1.3. LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS B ES UN PROCESO ALTAMENTE CONTROLADO	24
1.3.1. CAMBIOS DE MORFOLOGÍA EN LAS CÉLULAS B: MOTILIDAD DE TIPO AMEBOIDE	26
1.3.2. LAS MAPK EN LA MIGRACIÓN	27
1.3.3. LA REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA: RHO GTPASAS	27
1.3.3.1 La activación de rac1 promueve la formación del lamelipodio	28
1.3.3.2 Cdc42 en la polimerización de actina y control de la polaridad celular	28
1.3.3.3 Rho A controla la contractilidad del citoesqueleto de actina	29
1.3.4. LAS ERM: NEXO ENTRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA MORFOLOGÍA CELULAR	30
1.4. LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE TLR4Y LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS B	30
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. PURIFICACIÓN Y CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS B PRIMARIAS DE RATÓN	37
3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO	37
3.3. TINCIÓN INTRACELULAR DE F-ACTINA	38
3.4. INMUNOFLUORESCENCIA	38
3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT	38
3.6. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS RHO GTPASAS	39
3.7. ENSAYOS DE MIGRACIÓN EN CÁMARAS DE BOYDEN	40

3.8. MODELO DE MIGRACIÓN EN DOS DIMENSIONES SOBRE MEMBRANAS ARTIFICIALES	40
3.9. MODELO DE MIGRACIÓN EN UN ENTORNO TRIDIMENSIONAL CONFINADO	41
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
3.11. ANTICUERPOS Y OTROS REACTIVOS	42
4. RESULTADOS	45
4.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS B PRIMARIAS	47
4.2. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS B MEDIADA POR TLR4: MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CXCR4 Y CXCR5	48
4.3. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE TLR4 EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS B EN RESPUESTA A UN GRADIENTE QUIMIOTÁCTICO.	49
4.3.1. <i>MIGRACIÓN EN RESPUESTA A GRADIENTES DE CXCL12</i>	50
4.3.2. <i>MIGRACIÓN EN RESPUESTA A GRADIENTES DE CXCL13</i>	50
4.4. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN POR TLR4 EN LA MOTILIDAD DE LAS CÉLULAS B EN UN MODELO DE MIGRACIÓN EN DOS DIMENSIONES	51
4.4.1. <i>DINÁMICA DE CÉLULAS B EN PRESENCIA DE DISTINTAS DOSIS DE LPS</i>	52
4.4.2. <i>DINÁMICA DE CÉLULAS B TRAS SU ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE TLR4 DURANTE TIEMPOS CORTOS (4 H)</i>	54
4.4.3. <i>DINÁMICA DE CÉLULAS B TRAS SU ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE TLR4 DURANTE TIEMPOS LARGOS (24 H)</i>	55
4.5. TLR4 REGULA LA ADHESIÓN MEDIADA POR LFA-1/ICAM-1	57
4.6. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA A CCL21 POR LA SEÑALIZACIÓN VÍA TLR4	57
4.7. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LOS CAMBIOS DE COMPORTAMIENTO CELULAR MEDIADOS POR TLR A TIEMPOS CORTOS	60
4.7.1. <i>IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE MYD88</i>	61
4.7.2. <i>IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE TRIF</i>	61
4.8. PAPEL DE LAS MAPK EN LOS CAMBIOS EN DINÁMICA CELULAR MEDIADOS POR TLR4	63
4.8.1. <i>IMPLICACIÓN DE ERK1/2 EN LA RUTA DE TLR4 EN CÉLULAS B</i>	63
4.8.2. <i>PAPEL DE ERK1/2 EN LOS CAMBIOS EN DINÁMICA CELULAR POR TLR4 EN EL MODELO 2D. PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA PARA LA INHIBICIÓN DE ERK DURANTE LA ESTIMULACIÓN DE LPS SIN AFECTAR A LA MIGRACIÓN EN RESPUESTA A CXCL13</i>	66
4.8.3. <i>PARTICIPACIÓN DE P38α EN LA RUTADE SEÑALIZACIÓN DE TLR4</i>	68

4.8.4. PAPEL DE P38 α EN LOS CAMBIOS EN DINÁMICA CELULAR POR TLR4 EN EL MODELO 2D	70
4.9. IMPLICACIÓN DE P38 γ Y P38 δ MAPK EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE TLR4	71
4.9.1. CARACTERIZACIÓN DEL COMPARTIMENTO B DEL BAZO DE RATONES P38 $\gamma/\delta^{-/-}$	71
4.9.2. PAPEL DE P38 γ/δ EN LA ACTIVACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS B	71
4.10. LA ESTIMULACIÓN POR TLR4 MODIFICA LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE CXCR5	73
4.11. PAPEL DE LA FAMILIA DE LAS RHO GTPASAS EN LOS CAMBIOS DE COMPORTAMIENTO CELULAR PRODUCIDOS POR LA ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE TLR4	75
4.11.1. RHOA Y SU PRINCIPAL EFECTOR LA MIOSINA NO MUSCULAR DE TIPO II (NM-II)	75
4.11.2. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE MIGRACIÓN TRIDIMENSIONAL CONFINADO PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE NM-II EN CÉLULAS B	76
4.11.3. IMPLICACIÓN DE LA RUTA DE CDC42 EN LOS EFECTOS MEDIADOS POR TLR4	78
4.11.4. PAPEL DE RAC EN LA MODULACIÓN DE LA MIGRACIÓN POR TLR4	79
4.12. MODIFICACIONES EN EL CITOESQUELETO CORTICAL DE ACTINA MEDIADAS POR TLR4	82
5. DISCUSIÓN	85
5.1. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE TLR4 EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS B	87
5.2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LOS CAMBIOS EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS B	88
6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFIA	97
ANEXOS	115
ANEXO I. VIDEOS	117
ANEXO II. PUBLICACIONES	119

SUMMARY



B cells are constantly migrating in follicles, where they survey for the presence of potential antigens. The recognition of specific antigen through the B cell receptor (BCR) initiates the humoral immune response. B cells also express a wide range of innate-like receptors, including several members of the Toll-like receptor (TLR) family. TLR recognition of pathogen-associated ligands has important effects in a number of B cell functions: enhances antigen presentation capacity and promotes cytokine secretion, cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. TLR ligands detection also modifies B cell localization and trafficking. Nevertheless, the direct role of TLR signaling on B cell dynamics remains almost entirely unknown.

Using a two-dimensional model combined with real-time microscopy, we analyzed the effects of TLR4 signaling on B cell motility. We found that 4 h of TLR4 stimulation modulates B cell migration in response to chemokines. This short-term TLR4-stimulation increases B cell adhesion, polarization, migration and directionality in response to CXCL13. These effects are dependent on the MyD88-dependent signaling pathway, with little implication of the TRIF-mediated route. ERK and p38 MAPK regulate cellular migration and inflammatory responses; 4 h-TLR4 stimulation increases CXCR5 levels at the B cell surface and enhances CXCL13-mediated ERK activation. Both effects might aid in the observed enhancement of B cell dynamics; however, they do not explain all the described effects.

We explored TLR4-mediated regulation of Rho GTPase family members and ERM proteins, important for cell migration. We found that TLR4 stimulation enhances Rac GTPase activity and promotes sustained Rac activation in response to chemokines. As a result, actin polymerization is increased, probably through the higher activity of the Rac-effector PAK. We also proposed that the enhanced PAK activity regulates NM-II activation and thus, actomyosin contraction and integrin-mediated adhesion in TLR4-stimulated B cells. Finally, the level of active ERM, in particular Moesin, is also increased in LPS-treated B cells. All these molecular changes might be responsible of B cell dynamics modulation by TLR4.

In summary, TLR4 signaling could improve B cell antigen-seeking efficiency by a molecular mechanism that involves a Rac/PAK/NM-II/moesin signaling complex.

1. INTRODUCCIÓN



1.1. La célula B

Los linfocitos B o células B se originan a partir de células madre hematopoyéticas en el hígado fetal embrionario o en la médula ósea adulta, de donde salen al torrente circulatorio para incorporarse a los órganos linfoides secundarios (OLS): bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer (Rolink *et al.*, 2001). Las células B son el principal efector de la respuesta inmunológica adaptativa humoral; reconocen antígenos presentes en los patógenos a través del receptor de células B (*B cell receptor*, BCR), lo cual resulta en último término en la generación de anticuerpos de alta especificidad por el antígeno para promover la eliminación del patógeno. Aunque ésta es considerada su principal función en la respuesta inmunológica, las células B participan en otros aspectos de la misma mediante la producción de distintas citoquinas, y la presentación de antígeno y estimulación de células T, entre otros.

1.1.1 Tipos de células B

Las células B periféricas se clasifican en varios tipos, atendiendo principalmente a su localización anatómica y a diferencias en su función. Las células B de tipo B1 se localizan mayoritariamente en las cavidades peritoneal y pleural (Lalor *and* Morahan, 1990). Producen la inmunoglobulina de tipo M (IgM) denominada “natural” en bajos niveles, presente en el torrente circulatorio en ausencia de infecciones. Las células B B1 reconocen a través del BCR antígenos de tipo polisacárido, comúnmente presentes en la superficie de bacterias. La activación por antígeno de las células B B1 da lugar a una respuesta rápida, independiente de la co-estimulación de células T y denominada de tipo II (respuesta TI-II), que tiene como resultado la generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos de tipo IgM como una primera barrera de defensa contra el patógeno invasor (Kantor *and* Herzenberg, 1993; Erickson *et al.*, 2001) (Fig. 1A).

El otro tipo de células B es el denominado B2, que a su vez se divide en dos subtipos principales: células B foliculares (FO) y células B de la zona marginal (*Marginal Zone*, MZ) (Fig. 1B-C). Las células B FO se localizan en los OLS formando estructuras denominadas folículos (Fig. 2). Tienen la capacidad de recircular a través del torrente sanguíneo y la linfa entre los OLS; esta migración maximiza las posibilidades de encontrar antígeno específico. El reconocimiento de antígeno a través del BCR da lugar a una respuesta inmunológica humoral en general dependiente de la colaboración con células T (T-dependiente, TD), que conduce a la generación de anticuerpos altamente específicos o de alta afinidad por el antígeno y de la memoria inmunológica (Gray *et al.*, 1994). Las células B FO pueden también desarrollar respuestas en ausencia de co-estimulación de la célula T, cuando ésta es sustituida por la co-estimulación por ciertas citoquinas tales como APRIL, producidas por otras células del sistema inmune (Shulga-Morskaya *et al.*, 2004; von Bulow *et al.*, 2001).

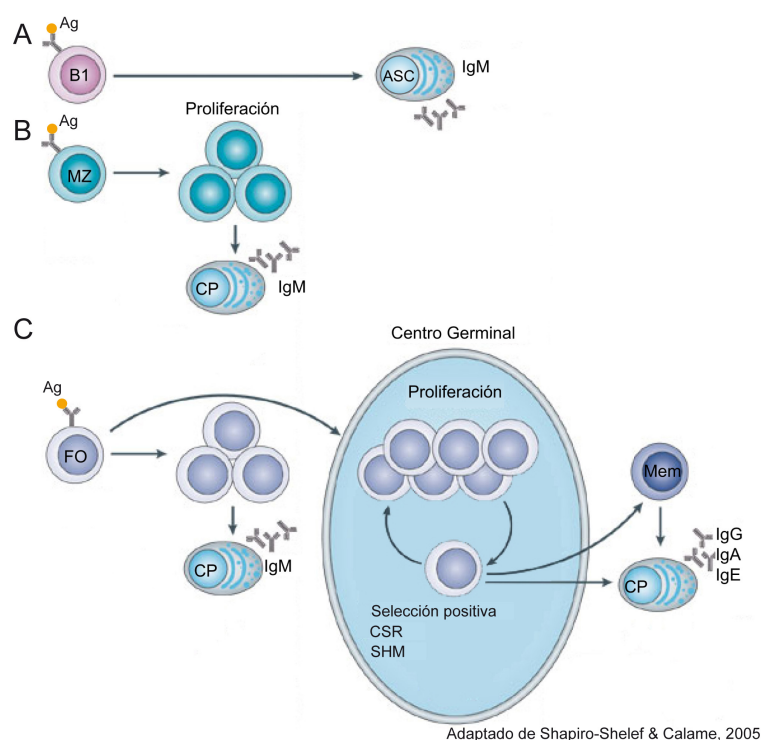


Figura 1. Tipos de células B y su función. **A**, Células B B1, el reconocimiento de antígeno promueve su diferenciación a célula secretora de anticuerpos de tipo IgM (ASC). **B**, Células B de la zona marginal (MZ), proliferación y diferenciación a célula plasmática (CP) secretora de IgM en respuesta a antígeno. **C**, Células B foliculares (FO), el reconocimiento de antígeno resulta en una respuesta T-dependiente; diferenciación temprana a CP secretora de IgM o formación del Centro Germinal donde tienen lugar proliferación, cambio de clase de inmunoglobulina (CSR), hipermutación somática (SHM), y selección positiva por antígeno (*affinity maturation*), todo ello encaminado a la generación de CP secretoras de anticuerpos de tipo IgG, IgA y/o IgE de alta afinidad y células B de memoria (Mem).

Las células B MZ sólo se localizan en el bazo, en el área denominada seno marginal y que se encuentra rodeando la pulpa blanca, separándola de la pulpa roja donde desemboca el torrente sanguíneo (Fig. 2). Por su localización, las células B MZ reconocen antígenos que llegan a través de la sangre; producen mayoritariamente respuestas de tipo TI, contribuyendo a la producción temprana de IgM (Allman and Pillai, 2008). Además, ayudan en el transporte de antígeno a los folículos para facilitar su encuentro y reconocimiento por parte de las células B FO y el desarrollo de la respuesta TD (Cinamon *et al.*, 2008).

1.1.2. Tipos de respuesta inmunológica de las células B

1.1.2.1 Características generales de la respuesta adaptativa humoral de tipo TD

La respuesta inmunológica de las células B se inicia por el reconocimiento del antígeno a través del BCR, evento que ocurre principalmente en los folículos de los OLS (Fig. 3). Ésto produce la activación de la célula B, y conlleva cambios en la expresión de varios tipos de moléculas en su superficie implicadas en la

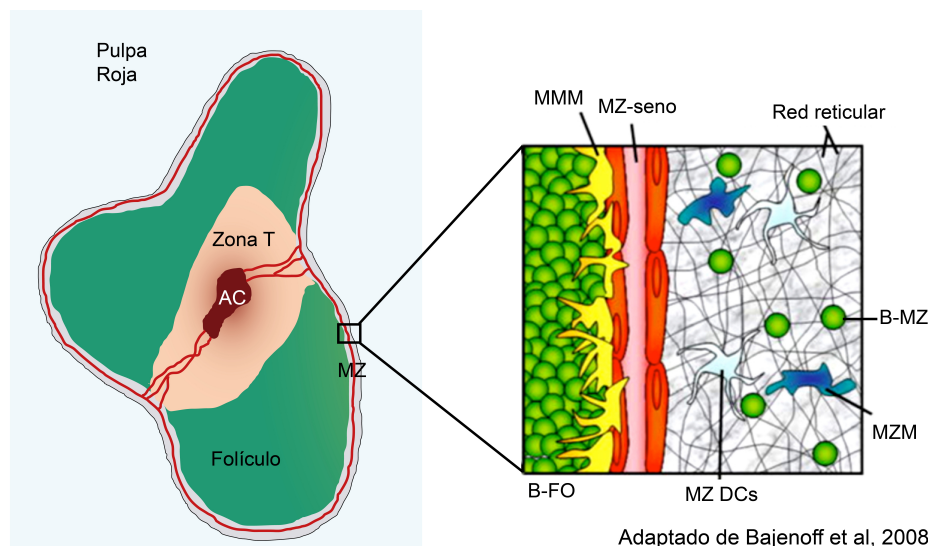
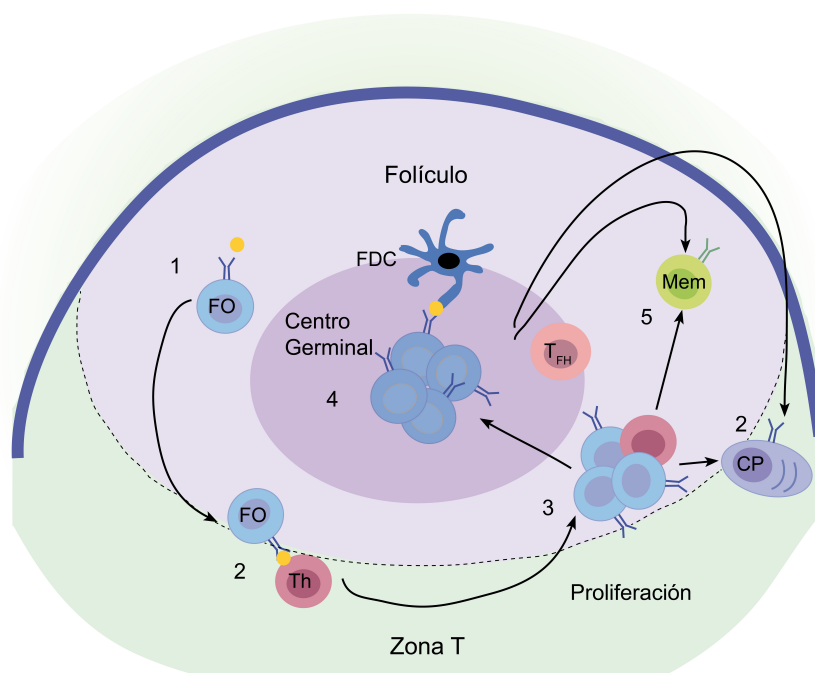


Figura 2. Esquema de la organización de la pulpa blanca y la zona marginal del bazo. AC: Arteriola central; MZ: Zona marginal; B-FO: células B foliculares; B-MZ: células B de la zona maginal; MZ DCs: Células dendríticas de la zona marginal; MZM: Macrófagos de la zona marginal; MMM: Macrófagos metalofílicos de la zona Marginal

presentación de antígeno a células T y en migración. Las células B activadas migran desde el folículo hacia el borde entre el folículo y la zona del paracórtex en el ganglio linfático, o la vaina linfática periarterial (*periarteriolar lymphoid sheaths*, PALS) en el bazo, donde se localizan las células T (Liu *et al.*, 1991; Reif *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2005). En esta localización, las células B presentan péptidos antigénicos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (*Major histocompatibility complex-II*, MHC-II) a las células T. Cuando la célula T reconoce el péptido antigénico, interacciona de manera transitoria con la célula B, permitiendo la co-estimulación de la célula B a través de la interacción de CD40 con CD40L expresado en la célula T (Elgueta *et al.*, 2009). Esta estimulación provee a la célula B de señales de supervivencia y proliferación, y resulta en la migración de las células B hacia la zona interfolicular, próxima al seno subcapsular en los ganglios linfáticos o al denominado *bridging channel* en el bazo (Liu *et al.*, 1991; Reif *et al.*, 2002). En este estadio y en esta nueva localización, las células B bien se diferencian a células plasmáticas extrafoliculares que inician la producción de anticuerpos en respuesta al antígeno (Chan *et al.*, 2009), bien migran de nuevo al interior del folículo para formar el centro germinal (*Germinal Center*, GC). En el GC tienen lugar los procesos de reordenamientos de los exones de las inmunoglobulinas, conocido como cambio de clase (*Class Switching*, CS), y de hipermutación somática (*Somatic hypermutation*, SHM) en las regiones variables de la inmunoglobulina. Como resultado de estos procesos de maduración y procesos de selección positiva por antígeno (*affinity maturation*), se generan células B de memoria y células plasmáticas de vida larga que producen anticuerpos altamente específicos contra el antígeno (Fig. 3).



Adaptado de Goodnow et al, 2010

Figura 3. Estadios de la respuesta humoral TD. 1, Las células B FO reconocen antígeno específico en el folículo; 2, migran al borde con la zona T para presentar el antígeno y recibir co-estimulación de células T helper (Th). 3, Migración a la zona interfolicular/*bridging channel* e iniciación de proliferación. Las células B migran entonces al folículo para formar el Centro Germinal (4), donde, en colaboración con células Th foliculares (TFH) y FDC (células presentadoras de antígeno para células B), tienen lugar procesos de proliferación, hipermutación somática, cambio de clase y selección positiva. Todo ello culmina en (5) la generación de células B de memoria (Mem) y células plasmáticas (CP) secretoras de anticuerpos específicos de antígeno de alta afinidad. Algunas de las células B del estadio (2) se diferencian de manera temprana a CP productoras de IgM.

1.1.2.2. El papel de las células B en la respuesta inmune de tipo innato

El sistema inmune innato tiene la capacidad de distinguir los patógenos de las células propias del organismo. Esta discriminación se basa en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), comunes entre diferentes tipos de patógenos (Akira *et al.*, 2006). Las células pertenecientes al sistema inmune innato son principalmente macrófagos, neutrófilos y células dendríticas; éstas expresan en su superficie receptores denominados PRR (*pattern recognition receptors*), cuya estimulación por PAMP activa la fagocitosis de los patógenos y la producción de citoquinas pro-inflamatorias que inician la respuesta inmune innata (Qi *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2001).

Las células B, además del BCR, expresan distintos PRR. La estimulación por PAMP de células B da lugar a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Barr *et al.*, 2007), proliferación, diferenciación a células plasmáticas en ausencia de antígeno y producción de anticuerpos de diferentes isotipos (Gururajan *et al.*, 2007; Genestier *et al.*, 2007) (Fig. 4). La promiscuidad en el reconocimiento de PAMP por PRR en contraposición a la especificidad del BCR por el antígeno, hace que los

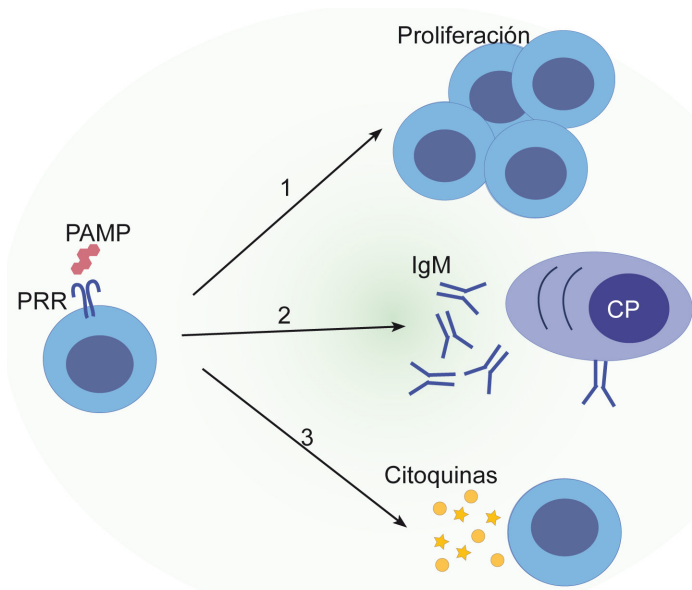


Figura 4. Respuestas de las células B a estímulos de tipo innato. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a través de los PRR en las células B puede dar lugar a varias respuestas: **1**, Proliferación; **2**, Generación de células plasmáticas (CP) secretoras de anticuerpos de tipo IgM; **3**, Producción de citoquinas pro-inflamatorias.

PRR se consideran receptores propios de las células del sistema inmune innato. Por todo ello, se empieza a considerar a las células B como integrantes del sistema y respuesta de tipo innato.

1.2. Los receptores de tipo Toll en la respuesta inmunológica

La familia de los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR) son los PRR más estudiados. Desde el descubrimiento del primer homólogo en mamíferos del receptor Toll de *Drosophila*, denominado TLR4 (Medzhitov *et al.*, 1997), se han descrito hasta 13 miembros de esta familia en ratón. Los receptores TLR1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie celular y reconocen PAMP presentes en la superficie de los patógenos, mientras que los TLR 3, 7, 8 y 9 se localizan en endosomas y reconocen ácidos nucleicos de origen vírico y bacteriano (Takeda *et al.*, 2003) (Fig. 5).

La estimulación por PAMP a través de los TLR de las células del sistema inmune innato (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas) desencadena la respuesta inmunológica de tipo innato. Esta respuesta se inicia con la secreción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, que producirán la infiltración de los leucocitos (Iwasaki *and* Medzhitov, 2004) y con ello, el desarrollo de una reacción de inflamación en el foco de la infección. La infiltración leucocitaria se favorece mediante cambios en la expresión de distintos tipos de moléculas de adhesión (selectinas, integrinas) así como de receptores de quimioquinas inflamatorias, que actúan como

quimioatrayentes hacia la zona inflamada, tanto en la superficie del endotelio próximo al foco de la infección como en los leucocitos (Gonzalez-Amaro *et al.*, 1998).

Los TLR además participan en la respuesta inmunológica adaptativa de distintas formas. La estimulación de células dendríticas a través de TLR en tejidos periféricos, promueve su activación y maduración, así como su migración a los OLS donde presentarán péptidos antigénicos a las células T (Banchereau *and* Steinman, 1998; Hertz *et al.*, 2001). El efecto de los productos microbianos como adyuvantes para la respuesta inmunológica adaptativa es bien conocido (White, 1976; Friedman, 1983; Ivins *et al.*, 1992; Reis e Sousa *and* Germain, 1999). La co-estimulación con ligandos de TLR de células B optimiza su activación por antígeno y la producción de anticuerpos en respuestas inmunológicas adaptativas de tipo TD (Pasare *and* Medzhitov, 2005; Minguet *et al.*, 2008). Ligandos de TLR pueden inducir CS en células B en respuestas inmunológicas de tipo TI (Gururajan *et al.*, 2007).

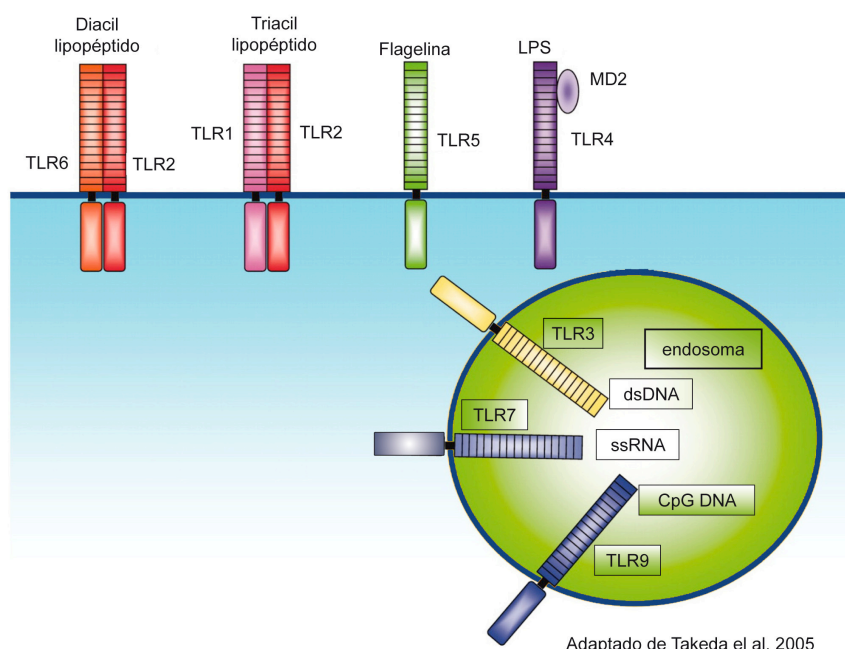


Figura 5. La familia de los TLR: localización y ligandos

1.2.1. La cascada de señalización de TLR4

Para el desarrollo de este trabajo de tesis elegimos como modelo de PRR a TLR4, expresado en la superficie de células B. TLR4 es una proteína transmembrana con un dominio extracelular que contiene repeticiones en tándem de un motivo rico en leucinas, un dominio transmembrana y un dominio intracelular denominado TIR, con una alta homología en su secuencia con el dominio intracelular del receptor de la Interleuquina-1 (IL-1R). En particular, TLR4 se encuentra en la membrana plasmática de células B formando complejos con la proteína MD2, necesaria para el reconocimiento de su ligando, lipopolisacárido (LPS), presente en la pared celular de

bacterias *gram*-negativas (Shimazu *et al.*, 1999; Akashi *et al.*, 2000). Además, TLR4 puede formar heterodímeros con el complejo RP105-MD1, el cual parece facilitar la señalización de LPS a través del complejo TLR4-MD2; sin embargo, tampoco se descarta que actúe como regulador negativo de TLR4 en células B, como se ha visto para macrófagos y células dendríticas (Divanovic *et al.*, 2007). La unión de LPS produce la dimerización del complejo TLR4-MD2, que inicia la cascada de señalización; ésta culmina en la activación de los factores de transcripción NF- κ B, AP-1 e IRF-3, que promueven la producción de citoquinas pro-inflamatorias e interferón (IFN) de tipo-I. TLR4 recluta a través del dominio intracelular TIR dos moléculas adaptadoras diferentes, MyD88 y TRIF; cada una da lugar a rutas de señalización distintas (Fig. 6).

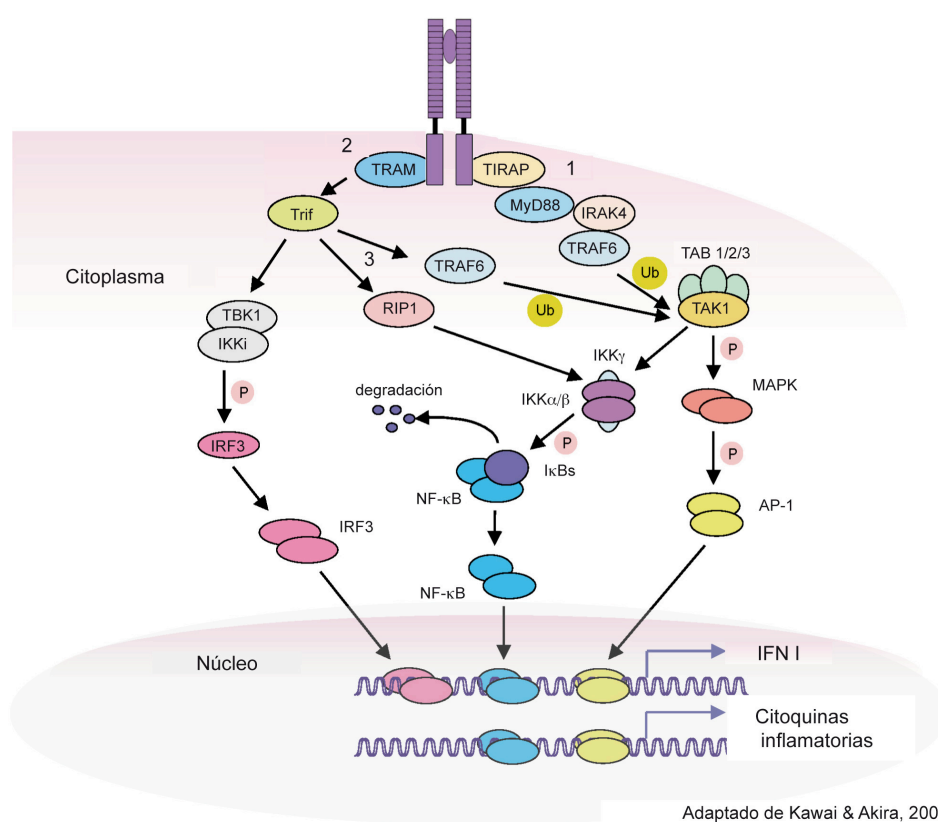


Figura 6. Rutas de señalización de TLR4. 1, Ruta dependiente de MyD88, activa las MAPK, y resulta en la producción de citoquinas inflamatorias mediante la activación y translocación al núcleo de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. 2, Ruta dependiente de TRIF, conlleva la activación y translocación al núcleo de IRF-3 y promueve la producción de interferón de tipo-I (IFN-I). 3, Confluencia de las rutas de MyD88 y TRIF.

1.2.2.1 Ruta de señalización dependiente de MyD88

Esta ruta se inicia con el reclutamiento de las moléculas adaptadoras TIRAP y MyD88, que se unen al dominio TIR. MyD88 a su vez recluta a proteínas IRAK, que se activan mediante fosforilación. Ello produce la unión de la proteína TRAF6 y su activación; mediante ubiquitinación se activa la quinasa TAK1 que fosforila y activa

el complejo IKK compuesto por las proteínas IKK α , IKK β y NEMO, y éste a su vez promueve la fosforilación del complejo I κ B que mantiene secuestrado en el citosol al factor de transcripción NF- κ B (Kawai *and* Akira, 2006). TAK1 a su vez activa a las MAPK p38 y JNK, a través de MKK3 y MKK6, y a ERK1/2, a través de MEK1/2 (Sato *et al.*, 2005), lo cual termina en la activación del factor de transcripción AP-1 por fosforilación. Cuando NF- κ B es liberado y AP-1 activado, ambos se translocan al núcleo donde inducen los genes necesarios para la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Fig. 6).

1.2.2.2 Ruta de señalización dependiente de TRIF

Esta ruta alternativa se inicia con la endocitosis de TLR4, que favorece el reclutamiento de la molécula adaptadora TRAM al dominio TIR, habilitando la unión de TRIF. TRIF posee un dominio de unión a TRAF6 y participa en su activación. Además se une a la proteína RIP-1, que también participa en la activación del complejo IKK. Estas dos rutas convergen con la vía dependiente de MyD88, amplificando la activación de NF- κ B y por tanto, la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Además, la unión de TRIF con las IKK no canónicas TBK1 e IKK ϵ resulta en la activación de estas quinasas, que a su vez fosforilan al factor de transcripción IRF-3; la activación de IRF-3 produce su translocación al núcleo donde favorece la transcripción de IFN de tipo-I (Fig. 6).

1.3. La migración de las células B es un proceso altamente controlado

Las células B están en continuo movimiento sobre la red de células foliculares dendríticas (*follicular dendritic cells*, FDC) existente en los folículos de los OLS, con el fin de maximizar las posibilidades de encontrar antígeno específico. Esta migración está mediada por la quimioquina CXCL13, producida por las FDC y expuesta en su superficie, y su receptor CXCR5, expresado en la membrana plasmática de las células B (Bajenoff *et al.*, 2006) (Fig. 7). La ausencia de un gradiente de CXCL13 en el folículo promueve un movimiento aleatorio (*random migration*) de las células B, con una velocidad media de 6 μ m/min (Miller *et al.*, 2002).

Como se ha comentado anteriormente, las células B varían su localización en los OLS durante la respuesta inmunológica humoral, fundamental para el desarrollo de la misma (Okada *and* Cyster, 2006). Estos cambios de localización están regulados principalmente por la expresión diferencial de las quimioquinas CXCL13 y CCL21 en distintas localizaciones de los OLS (CXCL13 por FDC en folículos; CCL21 por FRC en paracórtex), y por cambios en la expresión y funcionalidad de sus respectivos receptores, CXCR5 y CCR7, en las células B (Reif *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2005) (Fig. 7). Así, la migración de las células B hacia el paracórtex se produce por un aumento en los niveles de CCR7, mientras que la entrada de nuevo al folículo requiere una reducción de los niveles de CCR7 y un aumento en los de CXCR5 (Mueller *et al.*,

2007). CXCR4 y su ligando CXCL12 también son importantes para los cambios de localización de las células B en el contexto de la respuesta inmunológica, regulando la organización de los centros germinales junto con CXCR5 (Allen *et al.*, 2004), y también participa en la entrada de las células B a los OLS a través de las vénulas del endotelio alto (*High Endothelial Venules*, HEV) junto con CCR7 (Okada *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2009).

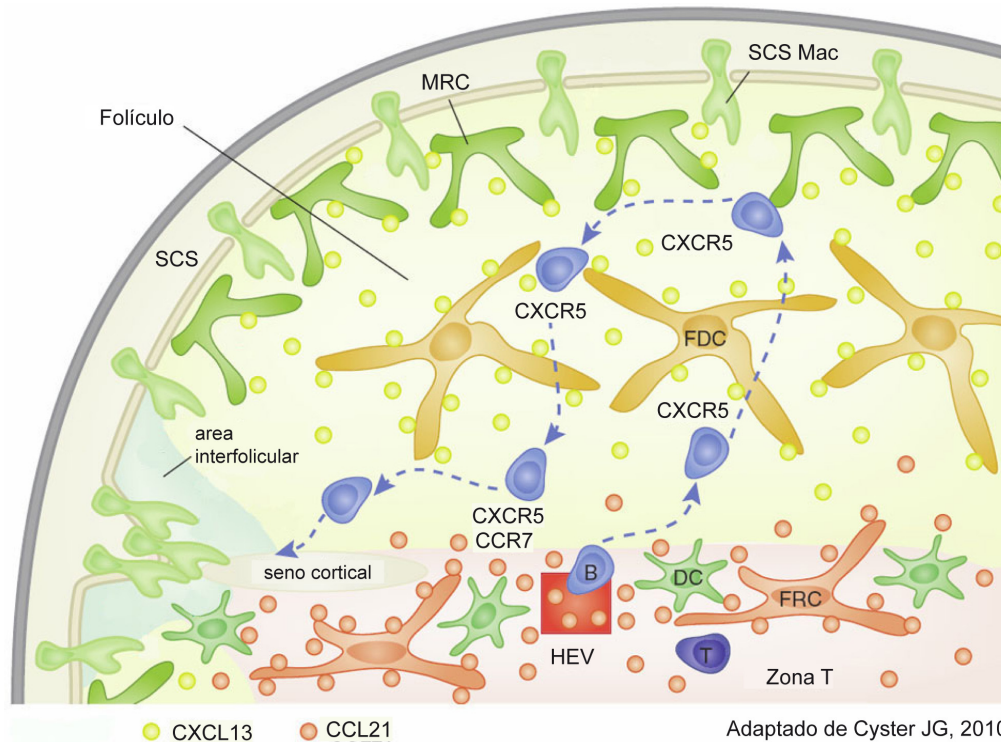


Figura 7. Patrón de migración de las células B en el folículo. Las células B entran en los ganglios linfáticos a través de las vénulas del endotelio alto (HEV) y migran en respuesta a CXCL13, producido por las células foliculares dendríticas (FDC), hacia el folículo. En el folículo, las células B se mueven de manera aleatoria (*random migration*) sobre la red de FDC. En ausencia de antígeno, las células B salen del ganglio por el seno cortical, localizado en la zona interfolicular, y recirculan hacia otros OLS. SCS, seno subcapsular; SCS Mac, macrófagos del SCS; MRC, células reticulares marginales; DC, célula dendrítica; FRC, fibroblastos reticulares

Las FDC expresan en su superficie moléculas de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas tales como ICAM-1, ligando principal de la integrina LFA-1 expresada en la superficie de las células B. La señalización de CXCL13 a través de CXCR5 activa LFA-1 mediante cambios de conformación que facilitan su interacción con ICAM-1 (Constantin *et al.*, 2000). La participación de integrinas y moléculas de adhesión en la motilidad de los leucocitos en los OLS es un tema controvertido. Las células dendríticas son capaces de moverse *in vivo* en ausencia de integrinas (Lammermann *et al.*, 2008); sin embargo, otras observaciones *in vivo* han revelado que las células B se desplazan sobre la red de FDC, que expresan ICAM-1 (Bajenoff *et al.*, 2006). Además, LFA-1 tiene un papel crítico en facilitar el encuentro con antígeno y la activación de las células B mediante la formación de la Sinapsis Inmune (Carrasco *et al.*, 2004; Carrasco and Batista, 2006).

La estimulación de los TLR también tiene efectos diversos sobre la migración de células del sistema inmune. Neutrófilos expuestos a LPS reducen su capacidad de migración en respuesta a IL-8 (Hayashi *et al.*, 2003); la exposición a ligandos de TLR de células B B1 cambia su localización *in vivo*, salen del peritoneo y migran hacia los OLS, principalmente el bazo, para el desarrollo de la respuesta inmunológica (Ha *et al.*, 2006). La localización de las células B MZ en el bazo varía en respuesta a ligandos de TLR (Rubtsov *et al.*, 2008).

1.3.1. Cambios de morfología en las células B: motilidad de tipo ameboide

La estimulación a través de los receptores de quimioquinas produce cambios en la morfología de las células B (polarización celular), necesarios para la migración de tipo ameboide característica de leucocitos. El movimiento de tipo ameboide se caracteriza por ser rápido, por carecer de fuertes interacciones de adhesión y por preservar la integridad del tejido; ello confiere a la células una gran capacidad de exploración e integración rápida de señales del espacio extracelular. En el movimiento ameboide ocurren varios procesos a nivel celular: 1) la generación del lamelipodio en el frente de avance, mediante la polimerización de actina; 2) el establecimiento de interacciones adhesivas con la superficie (matriz extracelular, células) sobre la que se desplazan, localizadas principalmente en la zona media del cuerpo celular, y desensamblaje de las previamente establecidas (tipo de movimiento ameboide por haptokinesis); 3) la contracción del citoesqueleto, mediada por la proteína motora no-muscular Miosina de tipo II (NM-II), que se concentra en la zona posterior de la célula (urópodo) y genera el desplazamiento de la célula en la dirección del lamelipodio (Fig. 8).

Dentro del movimiento ameboide dependiente de adhesión de los linfocitos (haptokinesis), se han definido dos tipos: *walking*, cuando las adhesiones al sustrato son débiles y el área de contacto con el mismo es pequeña; *sliding*, con mayor superficie de contacto entre célula y sustrato, y velocidades de migración bajas, debido bien a una elevada densidad de ligandos de integrinas, o bien a una menor funcionalidad de NM-II (Jacobelli *et al.*, 2009). La regulación y coordinación de las moléculas señalizadoras implicadas en todos estos procesos es fundamental para la óptima migración de los linfocitos.

Se ha observado que la estimulación de TLR tiene efectos sobre el citoesqueleto de actina y la morfología celular en células inmunes. La exposición de neutrófilos a LPS *in vitro* resulta en cambios morfológicos (Hayashi *et al.*, 2003); en células dendríticas, LPS produce un aumento en la generación de protrusiones de membrana y la desestabilización de las estructuras adhesivas ricas en actina denominadas podosomas (West *et al.*, 2004).

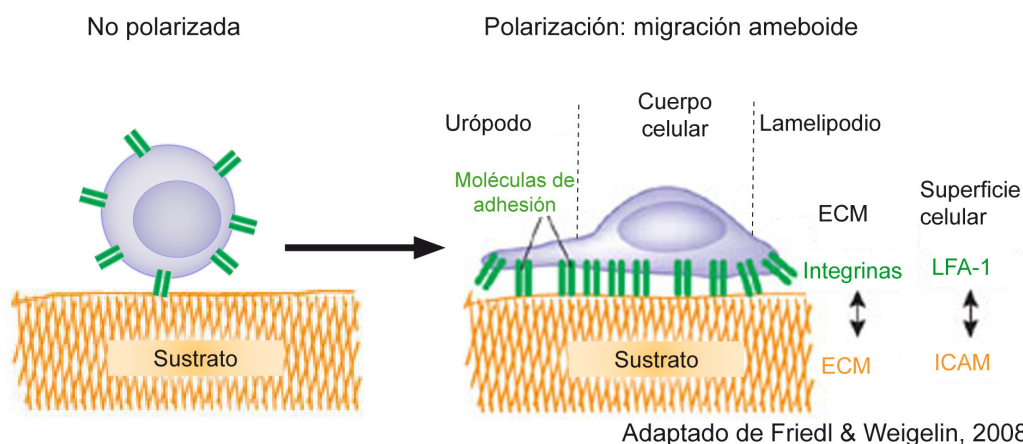


Figura 8. Cambios morfológicos celulares en el tipo de movimiento ameboide. La presencia de factores quimiotácticos promueve la polarización de la célula B, y con ello, la formación del lamelipodio y del urópodo, y la adhesión al sustrato mediante la activación de las integrinas (LFA-1).

1.3.2. Las MAPK en la migración

Las MAPK son una familia de serina/treonina quinasas que participan en la transducción de señales provenientes del medio extracelular, como factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas (Ashwell, 2006). Se dividen en tres subfamilias: ERK1/2, JNK y p38 MAPK. Su participación en rutas de señalización implicadas en procesos de proliferación, oncogénesis o inflamación es bien conocida (Johnson and Lapadat, 2002); más reciente es su papel en migración celular, particularmente para ERK1/2 y p38. ERK1/2 se activan por la estimulación de los receptores de quimioquinas (Ganju *et al.*, 1998); son necesarias para la migración de neutrófilos (Gu *et al.*, 2003) y células T mediada por CXCR4 (Vlahakis *et al.*, 2002), aunque no para la migración inducida por CCR7 (Bardi *et al.*, 2003). Más recientemente, ERK1/2 se ha implicado en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la generación del lamelipodio en macrófagos (Smith *et al.*, 2008).

Las p38 MAPK se componen de 4 isoformas, p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ , que se expresan en diferentes tejidos, excepto p38 α que se expresa en todos los tipos celulares. El desarrollo de inhibidores químicos para la activación p38 α ha permitido establecer que están implicadas en la migración de neutrófilos (Heuertz *et al.*, 1999); durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha descrito que p38 δ es necesaria para la migración de los neutrófilos hacia el foco de la inflamación (Ittner *et al.*, 2012).

1.3.3. La remodelación del citoesqueleto de actina: Rho GTPasas

La familia de las Rho GTPasas regulan los cambios de morfología y la migración de los linfocitos (del Pozo *et al.*, 1999) (Fig. 9). Cuando estas proteínas pasan de un estado inactivo, unidas a GDP, a un estado activo, unido a GTP, se asocian

a la membrana plasmática. Estos cambios en su activación están regulados por proteínas GEF (*guanine nucleotide exchange factors*), que median su activación y asociación con la membrana plasmática, y proteínas GAP (*GTPase-activating proteins*), que promueven la hidrólisis del GTP a GDP y por tanto su inactivación. Además, otras proteínas denominadas GDI (*GDP dissociation inhibitors*) secuestran a las GTPasas en el citosol, impidiendo su activación. Los miembros de la familia de las Rho GTPasas mejor estudiados son RhoA, Rac1 y Cdc42, con funciones diferentes en la reorganización del citoesqueleto de actina pero estrechamente relacionados entre sí. En muchos casos están reguladas por los mismos GEF, y comparten efectores, como la protein-quinasa 21 (*p21-activated kinases*, PAK), que puede ser activada tanto por Rac1 como por Cdc42; PAK además tiene efectos sobre el efector de RhoA, NM-II (Sanders *et al.*, 1999). De esta forma parece asegurarse una perfecta coordinación de los diferentes aspectos necesarios para la polarización y migración celular.

1.3.3.1 La activación de Rac1 promueve la formación del lamelipodio

La activación de la cascada de Rac1 promueve la polimerización de actina en ramificaciones para formar el lamelipodio (Ridley *and* Hall, 1992) (Fig. 9). La delección de Rac1 en células B no tiene grandes efectos, debido a que expresan las proteínas homóloga Rac2 y Rac3 que suplen su defecto. La eliminación de Rac1/2 causa defectos en el desarrollo de células B maduras (Walmsley *et al.*, 2003), por lo que se han empleado formas dominantes negativas o constitutivamente activas de Rac para estudiar su función. Rac1 promueve la formación del lamelipodio en células B (Westerberg *et al.*, 2001; del Pozo *et al.*, 1999), y la inhibición de DOCK2, GEF de Rac1, reduce la capacidad de migración de las células B (Fukui *et al.*, 2001). Rac1 activa a su efector WAVE-2, que forma parte de un complejo junto con Abi, Sra-1, Nap125 y HSPC300 (Nolz *et al.*, 2006) y promueve su unión a Arp2/3 (*Actin-related proteins 2 and 3*); ello resulta en la activación de Arp2/3, que inicia la nucleación de nuevos filamentos de actina desde filamentos existentes (Innocenti *et al.*, 2004).

1.3.3.2 Cdc42 en la polimerización de actina y control de la polaridad celular

La activación de Cdc42 da lugar a la formación de filopodios, mediante la polimerización de filamentos de actina en haces paralelos (Nobes *and* Hall, 1995; Westerberg *et al.*, 2001). Cdc42-GTP se une a su efector WASP (*Wiskott–Aldrich Syndrome Protein*), y éste activa el complejo Arp2/3 que adiciona monómeros de actina a los filamentos existentes (Fig. 9). La deficiencia en la proteína WIP (*Wasp Interacting Protein*), que estabiliza WASP, provoca alteraciones en la generación de protrusiones en células T (Anton *et al.*, 2002); la deficiencia en WASP causa defectos en la formación de protrusiones, polarización y migración de las células B (Westerberg *et al.*, 2005). En neutrófilos se ha observado que el defecto en la terminación de la señalización de Cdc42 resulta en la generación de múltiples

lamelipodios, produciéndose un aumento en los cambios de dirección durante la migración (Szczur *et al.*, 2006). Cdc42, además, juega un papel central en la polarización celular mediante la activación del complejo PAR (PAR3-PAR6-PKC), el cual regula la relocalización del citoesqueleto de microtúbulos, del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y de los orgánulos celulares en diversos tipos celulares (Etienne-Manneville, 2004; Etienne-Manneville *and* Hall, 2003; Pegtel *et al.*, 2007). Un complejo similar se ha descrito para la regulación de la polarización en células T (Ludford-Menting *et al.*, 2005; Real *et al.*, 2007).

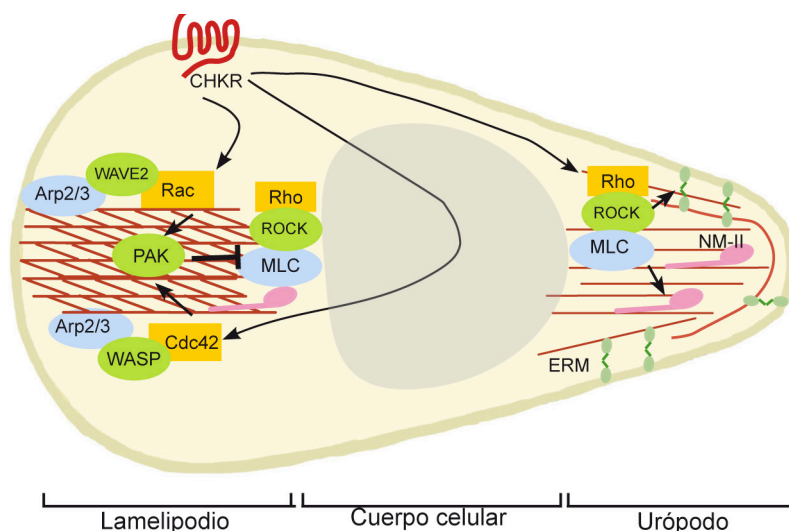


Figura 9. Principales funciones de las Rho GTPasas Cdc42, Rac y Rho en la polarización y migración celular. La señalización a través de los receptores de quimioquinas (CHKR) activa Rac y Cdc42 para la polimerización de actina en el lamelipodio, y Rho para la contracción del citoesqueleto de actina desde el urópodo. La activación de PAK regula negativamente la contracción mediada por activación de Rho en el lamelipodio.

1.3.3.3 Rho A controla la contractilidad del citoesqueleto de actina

Rho se localiza principalmente en la zona posterior de las células y promueve la contracción de los filamentos de actina (del Pozo *et al.*, 1997), que se genera gracias al desplazamiento paralelo de unos filamentos de actina sobre otros, y es realizada por la proteína NM-II (Sanchez-Madrid *and* del Pozo, 1999) (Fig. 9). NM-II está compuesta por dos cadenas pesadas, efectoras, y cuatro cadenas ligeras (MLC, *myosin light chain*), reguladoras de la función. Cuando Rho activa a la quinasa ROCK (*Rho-associated protein kinase*), ésta fosforila a MLC y, como resultado, se activa NM-II y el movimiento de los filamentos de actina (Sanchez-Madrid *and* del Pozo, 1999; Vicente-Manzanares *et al.*, 2005). La inhibición de ROCK en células T reduce drásticamente la polarización y la migración mediada por CCR7 (Bardi *et al.*, 2003). Además, NM-II está implicada en la regulación de las integrinas (Giagulli *et al.*, 2004) y del tipo de adhesión al sustrato (Jacobelli *et al.*, 2009), siendo por tanto crucial en la migración de los linfocitos.

1.3.4. Las ERM: nexos entre el citoesqueleto de actina y la morfología celular

Las proteínas Ezrina-Radixina-Moesina (ERM) participan en los cambios morfológicos celulares, siendo Moesina y Ezrina las isoformas expresadas en linfocitos. Las ERM conectan el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática; en su forma inactiva, adquieren una conformación plegada en el citosol, y su activación, producida por unión a lípidos asociados a la membrana plasmática (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP2) o a proteínas transmembrana (CD44, L-selectina, ICAM-3) y por fosforilación, resulta en una conformación extendida que se une por el dominio C-terminal a los filamentos de actina y por el extremo N-terminal a lípidos o proteínas de membrana (Yonemura *et al.*, 2002; Ivetic and Ridley, 2004).

La estimulación de linfocitos con quimioquinas produce la defosforilación transitoria de ERM, con pérdida de los microvilli y remodelación del citoesqueleto y morfología celular (Brown *et al.*, 2003). Las ERM se localizan en el urópodo, donde se encargan del reclutamiento de moléculas de adhesión y contribuyen al mantenimiento de esta estructura (Serrador *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). Su actividad está estrechamente ligada a Rho; ROCK fosforila y activa ERM en el urópodo (Lee *et al.*, 2004), y a su vez ERM media en la activación de Rho al liberarla de GDI (Takahashi *et al.*, 1997). Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha descrito en células B la localización de ERM en las zonas ricas en actina durante los estadios iniciales de polarización celular en respuesta a quimioquinas (Parameswaran *et al.* 2011).

1.4. La señalización a través de TLR4 y la migración de las células B

Las células B migran constantemente por los OLS para maximizar las posibilidades de encontrar los antígenos. Así mismo, durante la respuesta inmune humoral, las células B cambian su motilidad y localización dentro del OLS. El reconocimiento de antígeno específico a través del BCR resulta en la parada de la migración de las células B y la formación de la Sinapsis Inmunológica con la célula presentadora de antígeno. El establecimiento de esta estructura supramolecular implica una profunda reorganización del citoesqueleto y cambios drásticos de morfología celular (Carrasco *et al.*, 2004; Fleire *et al.*, 2006; Carrasco and Batista, 2007). Trabajos de nuestro grupo publicados durante la realización de esta tesis doctoral han revelado la compleja modulación del comportamiento de las células B por antígeno/BCR y CXCL13/CXCR5 (Saez de Guinoa *et al.*, 2011). Sin embargo, poco se sabe de los efectos que tienen estímulos de tipo innato a través de PRR en el comportamiento de las células B y con ello, en la respuesta inmune.

Esta tesis doctoral contribuye al esclarecimiento de los efectos de la estimulación a través de los receptores de tipo Toll sobre la migración de las células B.

2. OBJETIVOS



1. Caracterización de los efectos de estímulos de tipo innato a través de receptores de tipo Toll , en particular de TLR4 y su ligando LPS, en el comportamiento de las células B.

2. Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la modulación de la dinámica de las células B por la estimulación a través de TLR4.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Purificación y cultivo *in vitro* de células B primarias de ratón

Se aislaron células B primarias del bazo de ratones *wild-type*, ratones deficientes para MyD88 (Adachi *et al.*, 1998), TRIF (Hoebe *et al.*, 2003) o p38 γ/δ MAPK (Sabio *et al.*, 2005), y ratones transgénicos para I-Ab-GFP (Boes *et al.*, 2002), todos ellos en fondo genético C57BL/6; también se aislaron células B del bazo de ratones *wild-type* y deficientes para WIP (Anton *et al.*, 2002), en fondo genético 129/SvJ. Brevemente, tras sacrificar al animal mediante inhalación de CO₂, se extrajo el bazo y se disgregó con ayuda de un separador de células de nylon (diámetro de poro, 40 μ m; BD Falcon) en tampón fosfato salino (PBS). Las células mononucleares fueron separadas mediante centrifugación en gradiente de densidad (20 min x 2.700 rpm, a temperatura ambiente (RT) y sin freno), usando el medio de separación de células *Lympholite* para ratón (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada). A continuación, se lisaron los eritrocitos contaminantes con una solución de NH₄Cl al 0,75% (1 ml por bazo; 5 min a RT). La purificación de los linfocitos B se realizó por inmunoselección negativa, usando bolas magnéticas (Dynabeads® Mouse pan T (Thy1.2), Invitrogen Dynal AS). El grado de pureza obtenido fue > 95%, analizado por citometría de flujo. Para el proceso de purificación y posterior cultivo *in vitro* de las células B, utilizamos RPMI 1640 suplementado con 10% FCS (Fetal Calf Serum), 10 mM Hepes, 2 mM L-Glutamina y 50 μ M β -mercaptoetanol.

Las células B se mantuvieron en cultivo *in vitro* (2 x 10⁶/ml, 37°C, 5% CO₂) durante los tiempos indicados y en ausencia o presencia de LPS (*Escherichia coli* O128:B12, Sigma) a las concentraciones especificadas. Para el tratamiento con los inhibidores químicos de MEK1/2 (PD184352, 0,2 μ M), de p38 α (BIRB796, 0,1 μ M) (ambos provenientes de la Dra. Ana Cuenda; (Kuma *et al.*, 2005)), y de Rac (Rac Inhibitor III, EHop-016 2,5 μ M; Calbiochem), se añadieron al medio de cultivo 30 min antes que el LPS, y se mantuvieron en el mismo durante todo el tiempo de estimulación con LPS. LPS y/o inhibidor fueron eliminados del medio mediante lavado con RPMI 10% FCS y centrifugación.

3.2. Citometría de Flujo

Se incubaron 2 x 10⁵ células B (20 min, 4°C) con combinaciones de anticuerpos primarios conjugados directamente con fluorocromos y específicos para los marcadores de membrana IgM, IgD, B220, CD3, CD19, CD21, CD23, CD11a (LFA-1), CD62L, CD40, CD44, MHC-II, CD86 y CD69 (BD Pharmingen). Para los receptores de quimioquinas CXCR4, CXCR5 y CCR7, se utilizaron anticuerpos primarios conjugados con biotina (BD Pharmingen) y, tras un lavado, se incubó con el agente secundario streptavidina conjugada con PE (Beckman Coulter) (15 min, 4°C). El tampón utilizado en las incubaciones y lavados fue PBS con 1% BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma), 1% FCS y 10 mM NaN₃. Las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y usando el *software*

Cell Quest Pro (Becton Dickinson) o Flowjo 8.0 (Tree Star, Inc).

3.3. Tinción intracelular de F-actina

Se incubaron 2×10^5 células B con PBS al 2% de Paraformaldehído (PFA) (100 μ l, 10 min, RT) para su fijación, se lavaron y se permeabilizaron con PBS al 2% de saponina (5 min, RT). Alternativamente, usamos el kit IntraPrep (ref. A07803, Beckman Coulter) para fijar y permeabilizar, adaptado para 2×10^5 células. Tras un nuevo lavado, las células B se incubaron con AlexaFluor-647-Faloidina (15 min, RT). Las muestras se analizaron por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. El medio usado para lavados e incubaciones con faloidina fue PBS con 1% BSA, 1% FCS y 10 mM NaN_3 .

3.4. Inmunofluorescencia

Células B no-estimuladas o estimuladas con LPS (2,5 μ g/ml, 4 h) en contacto con membranas artificiales que contenían ICAM-1 y CXCL13, se fijaron con 4% PFA (10 min, 37°C), se lavaron y se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 en PBS (5 min, RT). A continuación, se bloquearon con PBS 2% FCS, 2% BSA (20 h, 4°C), y se incubaron con anticuerpos primarios que reconocían WAVE-2 (ver tabla 1) o la forma fosforilada de ERM (p-ERM, ver tabla 1) (30 min, RT), seguidos del correspondiente agente secundario conjugado con AlexaFluor-488 en combinación con AlexaFluor-647-Faloidina (Molecular Probes) (30 min, RT). Seguidamente, las muestras se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia usando un objetivo de inmersión 40x/NA1.2 en un microscopio invertido Zeiss Axiovert LSM 510-META (Zeiss, Alemania). Se tomaron imágenes secuenciales en el eje Z, con una sección óptica de 1 μ m entre ellas. Las imágenes adquiridas se analizaron con los *software* de LSM (Zeiss) e Image-J 1.41 (NIH).

3.5. Análisis de la expresión y activación de proteínas por Western-Blot

Para el estudio de la activación de ERK1/2 y p38 MAPK por TLR4, incubamos células B (5×10^6) en medio de depleción (RPMI 1640 con 0,5% FCS, 10 mM Hepes, 2 mM L-Glutamina, 50 μ M β -mercaptoetanol) (1 h, 37°C), y las estimulamos con LPS (2,5 μ g/ml, 37°C) durante los tiempos indicados y en agitación (300 rpm). Para detener la señalización, añadimos 1 ml de PBS frío (4°C) y centrifugamos las células (2.000 rpm, 5 min, 4°C). Las células se lisaron (30 min, 4°C) en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) al 1% Tritón X-100 y con inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche) y fosfatasas (PhosphoSTOP, Roche), y se centrifugaron (14.000 rpm x 30 min, 4°C). Los sobrenadantes se recogieron y congelaron a -80°C. Para analizar la activación de ERK1/2 y p38 por CXCR5, incubamos células B en medio de depleción (1 h, 37°C), a continuación añadimos o

no LPS (2,5 $\mu\text{g/ml}$) y dejamos las células en cultivo durante 4 h. Tras ese tiempo, las células B se recogieron y lavaron, y se estimularon con CXCL13 (100 nM) durante los tiempos indicados y en agitación (300 rpm); paramos la estimulación añadiendo PBS frío y lisamos las células como anteriormente. Para el resto de proteínas analizadas, las células B se cultivaron en RPMI 10% FCS en ausencia o presencia de LPS (2,5 $\mu\text{g/ml}$, 4 h), se recogieron, y lisaron en tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% desoxicolato sódico, 0,1% SDS) con inhibidores de proteasas y fosfatasa como anteriormente.

Cuantificamos la cantidad de proteína total en los lisados usando el kit Micro BCA Protein assay (Thermo Scientific). Cantidades equivalentes de proteína total se separaron por tamaño en geles de acrilamida/SDS, y se transfirieron a membranas de PVDF (*polyvinyl difluoride*; BioRad) o Nitrocelulosa (en el caso de p-MLC, p-PAK1/2, PAK1 y PAK2; GE Healthcare); las membranas se bloquearon con TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) al 2% BSA (1 h, RT), y se incubaron con los anticuerpos primarios indicados (20 h, 4°C, o bien 1 h, RT), seguido de los secundarios conjugados con HRP (*HorseRadish Peroxidase*; ver tabla 2) (1 h, RT). La detección de la señal se hizo mediante el uso de un sistema de quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare). La cuantificación de los niveles de proteína activada y total en cada caso se realizó mediante densitometría con el *software* Image-J 1.41 (NIH); cada valor se normalizó respecto del valor del control interno (niveles de α -tubulina) en cada caso, y se relativizó bien a su valor basal (tiempo 0; especificado en cada caso) o bien al valor de los niveles de la proteína total correspondiente (casos de ERK1/2 y p38 α).

3.6. Cuantificación de la actividad de las Rho GTPasas

La actividad o niveles de la forma unida a GTP de las distintas Rho GTPasas analizadas en lisados de células B, se determinaron usando los kits comerciales G-LISA® Rac activation (BK125), G-LISA Cdc42 activation (BK127) y G-LISA RhoA activation (BK124) (Cytoskeleton, Inc). Estimulamos células B en condiciones iguales a las utilizadas para algunos de los ensayos de western-blot (1 h de depleción, 4 h \pm LPS), seguido de la estimulación con CXCL13 (100 nM, en agitación). A continuación, las células se lisaron con el tampón de lisis del kit, y se cuantificaron los niveles de GTPasa activa en el lisado siguiendo las instrucciones del mismo y por duplicado. Brevemente, se disolvió el sustrato específico de la forma activa de las GTPasas y se incubaron los lisados en los pocillos (30 min, 4°C, en agitación); se retiró el volumen, se lavaron los pocillos, se añadió el tampón de presentación del antígeno (2 min, RT), y, tras un nuevo lavado, se incubaron con anticuerpo primario (45 min, RT, en agitación) seguido del anticuerpo secundario conjugado con HRP (45 min, RT, en agitación). Revelamos con la solución de detección de HRP (20 min, 37°C o RT para Rac); la reacción colorimétrica se detuvo con la solución del kit indicada para ello y según los tiempos sugeridos en el kit. Utilizamos un espectrofotómetro de

placas de 96 pocillos para medir la absorbancia a λ 490 nm.

3.7. Ensayos de migración en cámaras de Boyden

Se usaron placas de transwell de 24 pocillos, con membranas de policarbonato de 3 μ m de tamaño de poro (Corning). En el pocillo inferior de las cámaras se añadieron 600 μ l de medio \pm la quimioquina a ensayo (CXCL13, CXCL12 o CCL21, todas ellas recombinantes murinas; Peprotech) a las concentraciones indicadas. En el inserto superior se añadieron 3×10^5 células B en 100 μ l de medio. Tras una incubación de 2 h a 37°C, se contaron las células presentes en el pocillo inferior por citometría de flujo, durante 1 min a flujo alto; el número de células B de partida (*input*) se calculó contando de igual manera en una muestra que contenía 100 μ l de la solución inicial de células + 500 μ l de PBS. Los ensayos se realizaron en medio de cultivo (RPMI 10% FCS) y por duplicado. Cuando se indica, LPS estuvo presente en ambos pocillos de la cámara, superior e inferior, a las concentraciones especificadas. En otros casos, células B fueron estimuladas con LPS (2,5 μ g/ml, 4 h), y posteriormente puestas a migrar en las cámaras de Boyden. El porcentaje de migración se calculó como la proporción de células B que migraron respecto del total de células B añadidas (*input*) en cada punto. El índice de migración se calculó mediante el ratio de las células B que migraron en cada condición respecto de las que migraron en condiciones basales (ausencia de quimioquina).

3.8. Modelo de migración en dos dimensiones sobre membranas artificiales

Se realizaron ensayos de migración en un modelo en dos dimensiones (2D) basado en el uso de bicapas lipídicas artificiales planas (Carrasco *et al.*, 2004; Grakoui *et al.*, 1999) y optimizado en nuestro grupo. Brevemente, se generaron liposomas de 1,2-dioleoyl-fosfatidil-colina (DOPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.) que contenían o no ICAM-1 de ratón anclado por GPI (Glycosylphosphatidylinositol); se mezclaron DOPC-liposomas con DOPC-liposomas que contenían GPI-ICAM-1 para obtener las densidades moleculares deseadas para ICAM-1 (150-300 moléculas/ μ m²); se ensamblaron membranas planas sobre el cubreobjetos de cámaras de flujo cerradas FCS2 (Bioptechs), se bloquearon con PBS 2% FCS, y se incubaron con CXCL13 o CCL21 (100 nM) para su tapizado (20 min, RT) justo antes del ensayo. En cámaras FCS2 precalentadas (37°C), inyectamos 5×10^6 células B, las dejamos en contacto con las membranas durante 5 min, y seguidamente monitorizamos su comportamiento por microscopía confocal de fluorescencia en tiempo real. Tomamos series de imágenes de DIC (*Differential Interference Contrast*), IRM (*Interference Reflection Microscopy*) y fluorescencia cada 12 segundos durante 15 min, con un objetivo de inmersión 40x/NA1.2 usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert LSM510-META. Los ensayos se realizaron en PBS 0,5% FCS, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM

CaCl₂, 0,5 g/l D-glucosa.

Para estos ensayos, las células B recién aisladas (10^7 células/ml) se marcaron con las sondas fluorescentes CFSE o SNARF-1 (0,1 μ M, 37°C, 10 min, en PBS; Molecular Probes). Seguidamente, bien se inyectaron directamente en la cámara FCS2, o bien se pusieron en cultivo en ausencia o presencia de los reactivos indicados (LPS, inhibidores) y durante los tiempos especificados; se recogieron, se mezclaron en ratio 1:1 según se indica, y se pusieron en contacto con las membranas. Analizamos las imágenes adquiridas mediante los *software* ImageJ 1.41 (NIH) e Imaris 7.0 (Bitplane). La frecuencia de adhesión se calculó como [(nº células IRM⁺ en el tiempo de adquisición del video / nº total de células)*100]; la frecuencia de polarización se calculó como [(nº células que emiten protusiones de membrana de forma frecuente en el tiempo de adquisición del video / nº total de células)*100]; la frecuencia de migración corresponde al [(nº células IRM⁺ que se desplazan un mínimo de 5 μ m durante el tiempo de adquisición del video / nº total de células)*100]. Los valores de velocidad media (μ m/min) e índice de direccionalidad [distancia total recorrida (μ m) / distancia recorrida en línea recta (μ m)] de las células en migración se obtuvieron con el *software* de análisis Imaris 7.0 (Bitplane). Los valores de área de contacto e intensidad total de píxeles en la misma, detectada por IRM, se estimó a través de las medidas de área y suma de la intensidad de los píxeles (RawIntDen) para la región que confina la señal positiva de IRM, utilizando el programa Image-J 1.41 (NIH) e Imaris 7.0 (Bitplane).

3.9. Modelo de migración en un entorno tridimensional confinado

Utilizamos un modelo de migración confinado y en tres-dimensiones (3D) basado en el uso de microcanales (Faure-Andre *et al.*, 2008; Heuze *et al.* 2011). Brevemente, se generaron microcanales del tamaño deseado (4 x 4 μ m; 6 x 4 μ m) en una matriz de PDMS, mediante técnicas de litografía; a continuación, se activó la superficie de la matriz de PDMS permitiendo su pegado a la placa de cultivo, y se perforó a la entrada de los microcanales, creándose un pocillo donde añadir las células. Tapizamos la superficie de los microcanales con ICAM-1-Fc de ratón (R&D Systems) a varias concentraciones (en un rango de 0-160 nM) (1 h, 37°C), bloqueamos con PBS 2,5% FCS, e incubamos con CXCL13 (100 nM, 30 min, 37°C).

Se añadieron 1×10^5 células B, aisladas de ratones transgénicos para I-Ab-GFP y previamente estimuladas o no con LPS (2,5 μ g/ml, 4 h), en un volumen de 5 μ l al pocillo de entrada a los microcanales. Se incubaron los microcanales con las células durante 1 h a 37°C para permitir la entrada de las mismas, y seguidamente se monitorizó el comportamiento de las células en el interior de los microcanales por microscopía en tiempo real. Se tomaron imágenes de contraste de fase y fluorescencia (GFP) con un objetivo 10x en varias posiciones cada 2 min durante 6-10 h, usando un microscopio Nikon Eclipse Ti equipado con una cámara de incubación a 37°C y 5% CO₂. El medio usado para estos ensayos fue PBS 0,5% FCS, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM

CaCl₂, 0,5 g/l D-glucosa. El análisis de las imágenes adquiridas se realizó mediante la generación de kimógrafos de las células que se desplazaban en el interior de los microcanales durante el tiempo del ensayo usando el *software* Metamorph 7.5.6.0 (Universal Imaging Corp.).

3.10. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis estadístico de distribución-t (*Student t-test*) para datos no pareados y con un rango de confianza > 95%, utilizando el *software* Prism 4.0 (GraphPad). ns, no significativo; *, p<0.05; **, p<0.001; ***, p<0.0001.

3.11. Anticuerpos y otros reactivos

Tabla 1. Anticuerpos primarios. CF, citometría de flujo; IF, Inmunofluorescencia, WB, western-blot

Anticuerpo	Descripción	Uso	Dilución	Procedencia
anti-ratón-IgD-FITC	monoclonal rata	CF	1/200	Southern Biotechnology
anti-ratón-CCR7-biotina	clon 4B12 rata	CF	1/50	BD Pharmigen
anti-ratón-CD11a-PE	clon 2D7 rata	CF	1/100	Pharmigen
anti-ratón-CD19-PE	clon 6D5 rata	CF	1/200	Beckman Coulter
anti-ratón-CD21-FITC	clon 7G6 rata	CF	1/200	BD Pharmigen
anti-ratón-CD23-PE	clon B3B4 rata	CF	1/200	BD Pharmigen
anti-ratón-CD3-FITC	clon 145-2C11 hamster	CF	1/100	Beckman Coulter
anti-ratón-CD40-FITC	clon AF6-120.1 rata	CF	1/100	Beckman Coulter
anti-ratón-CD44-FITC	clon I3/23 rata	CF	1/100	Beckman Coulter
anti-ratón-CD62L-FITC	clon MEL-14 rata	CF	1/100	Beckman Coulter
anti-ratón-CD69-FITC	clon H1.2F3 hamster	CF	1/200	BD Bioscience
anti-ratón-CD86-PE	clon GL1 rata	CF	1/200	BioLegend

Anticuerpo	Descripción	Uso	Dilución	Procedencia
anti-Cdc42 (ACD03-A)	monoclonal ratón	WB	1/1000	Cytoskeleton
anti-ratón-CXCR4-biotina	clon 2B11 rata	CF	1/200	BD Pharmigen
anti-ratón-CXCR5-biotina	clon 268I rata	CF	1/200	BD Pharmigen
anti-Ezrin/Radixin/Moesin	policlonal conejo	WB	1/1000	Cell Signaling
anti-fosfo-Ezrin (Thr567)/ Radixin (Thr564)/ Moesin (Thr558)	policlonal conejo (41A3)	WB IF	1/1000 1/200	Cell Signaling
anti-fosfo-Myosin Light Chain (S19/S20)	policlonal conejo	WB	1/500	Rockland
anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr 182)	policlonal conejo (12F8)	WB	1/1000	Cell Signaling
anti-fosfo-p44/42 MAPK (T202/Y204)	policlonal conejo	WB	1/1000	Cell Signaling

Tabla 2. Anticuerpos secundarios y otros reactivos. CF, citometría de flujo; IF, Inmunofluorescencia, WB, western-blot

Anticuerpo	Descripción	Uso	Dilución	Procedencia
AlexaFluor647-Faloidina	-	CF IF	1/500 1/250	Molecular Probes
Streptavidina-PE	-	CF	1/200	Beckman Coulter
anti-Ig Conejo-HRP	policlonal cabra	WB	1/2000	Dako
anti-Ig Ratón-HRP	policlonal cabra	WB	1/2000	Dako
anti-IgG conejo-Alexa Fluor488	policlonal cabra	IF	1/500	Southern Biotechnology

4. RESULTADOS



4.1. Caracterización fenotípica de la población de células B primarias

Para el estudio de los efectos de los estímulos de tipo innato en la dinámica de las células B, trabajamos con la población de células B primarias aislada del bazo de ratones C57BL/6 mediante técnicas de selección negativa. El análisis fenotípico de dicha población por citometría de flujo mostró la expresión en superficie de CD19, marcador característico de células B, y de las Inmunoglobulinas de tipo M y D (IgM e IgD) (pureza > 95%), fenotipo correspondiente a células B maduras (Fig. 10A). La población de células B de bazo se divide en dos subpoblaciones mayoritarias en base a la expresión del receptor del complemento CR2 (CD21) y del receptor de IgE (CD23): células B foliculares (FO; CD21⁺ CD23⁺) y células B de la zona marginal (MZ; CD21^{hi} CD23⁻). Ambos subtipos estaban presentes en la población de células B aislada y en los porcentajes esperados (Fig. 10A). Analizamos el estado de activación celular en base a los niveles de expresión en membrana de la lectina CD69 y la molécula co-estimuladora CD86; las células B purificadas mostraron un fenotipo correspondiente a células no activadas (CD69⁻ CD86^{low}) (Fig. 10A).

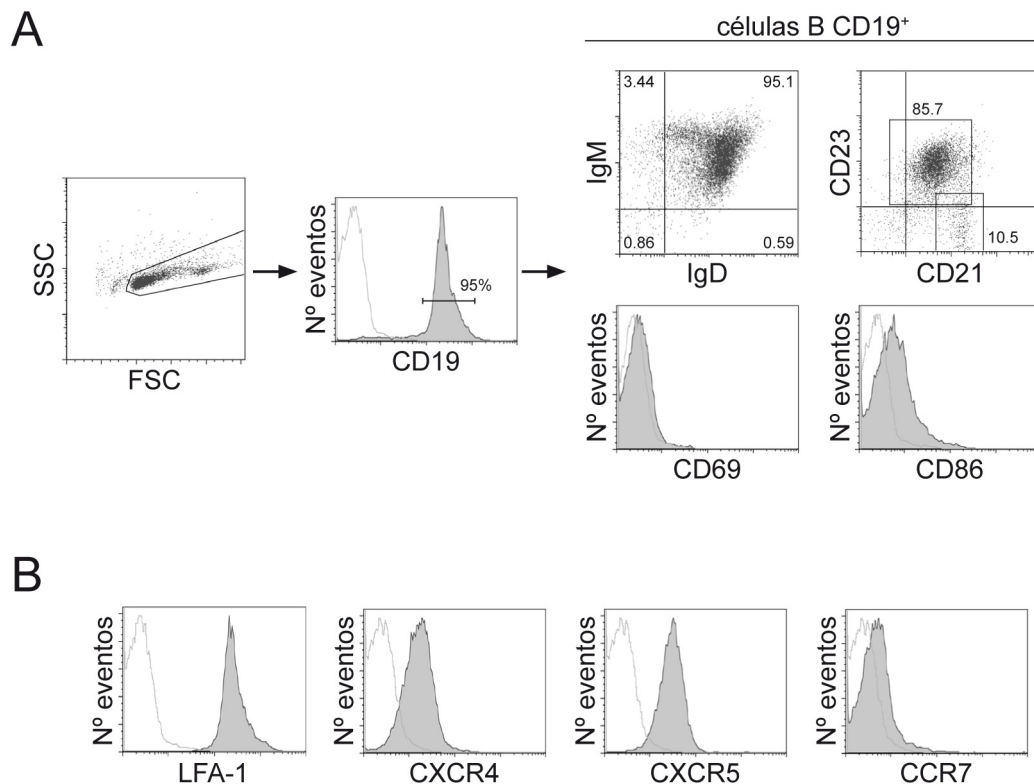


Figura 10. Caracterización fenotípica de la población de células B purificada

A, Diagrama de dispersión para tamaño celular (*Forward Scattered*, FSC) y complejidad celular (*Side Scattered*, SSC), y perfil de expresión de CD19 en la población de células B purificada (izquierda). Diagramas de dispersión para IgD/IgM y CD21/CD23, y perfiles de expresión para CD69 y CD86, en la población de células B CD19⁺ (derecha). Las regiones delimitan las fracciones de células B FO (CD21⁺CD23⁺) y células B MZ (CD21^{hi} CD23⁻). **B**, Perfiles de expresión de LFA-1, CXCR4, CXCR5 y CCR7 en la población de células B CD19⁺. Perfiles en línea discontinua, controles de isotipo. Datos mostrados en A, B corresponden a un experimento representativo.

La integrina LFA-1, así como los receptores de quimioquinas CXCR4, CXCR5 y CCR7, tienen un papel muy importante en los procesos de adhesión, migración y localización en los OLS de las células B. Comprobamos por citometría de flujo que la población de células B aislada expresaba en su membrana LFA-1, a niveles elevados, CXCR4, CXCR5 y CCR7, éste último a niveles bajos (Fig. 10B).

4.2. Activación de células B mediada por TLR4: modulación de la expresión de CXCR4 y CXCR5

Las células B expresan un amplio repertorio de PRR, siendo capaces de reconocer y responder a distintos estímulos de tipo innato. En este estudio nos centramos en los PRR de la familia Toll, y en particular en TLR4. Inicialmente, caracterizamos la activación de células B *in vitro* en respuesta a distintas dosis de Lipopolisacárido (LPS), componente de la pared bacteriana de bacterias *gram*-negativas y ligando de TLR4, y a distintos tiempos (4 y 24 h). Empleando una dosis de 0,25 µg/ml de LPS, observamos una activación parcial de la población de células B (~ 60% CD69⁺ CD86^{hi} a 24 h) (Fig. 11A). Dosis diez veces superiores de LPS (2,5 µg/ml) promovieron la expresión de CD69 a 4 h y un posterior aumento en los niveles de CD86 (24 h) en el 100% de las células B (Fig. 11A). La exposición a mayores concentraciones de LPS (25 µg/ml) resultaron también en la activación del 100% de la población, pero con una cinética de expresión de CD69 y CD86 más rápida.

Monitorizamos los posibles cambios en los niveles de expresión en membrana de CXCR4 y CXCR5 producidos por la estimulación de las células B a través de TLR4. Observamos que la expresión de CXCR4 aumenta significativamente tras 4 h de cultivo *in vitro*; a este tiempo no detectamos cambios debidos a la estimulación con LPS a las distintas dosis empleadas (Fig. 11B). Tras 24 h y en ausencia de LPS, los niveles de CXCR4 tienden a reducirse respecto de lo observado a 4 h; la estimulación con LPS disminuyó significativamente la expresión de CXCR4 a dosis que promovían la activación del 100% de las células B (2,5 y 25 µg/ml; Fig. 11B). La activación por LPS, sin embargo, causó un aumento significativo en los niveles de expresión de CXCR5, ya detectable a 4 h, y de manera dosis dependiente (Fig. 11B).

Los resultados indicaban, por tanto, que la dosis mínima necesaria de LPS para activar *in vitro* de forma completa la población de células B era de 2,5 µg/ml. La estimulación de TLR4 además regulaba la expresión de los receptores de quimioquinas CXCR4 y CXCR5, y con efectos opuestos.

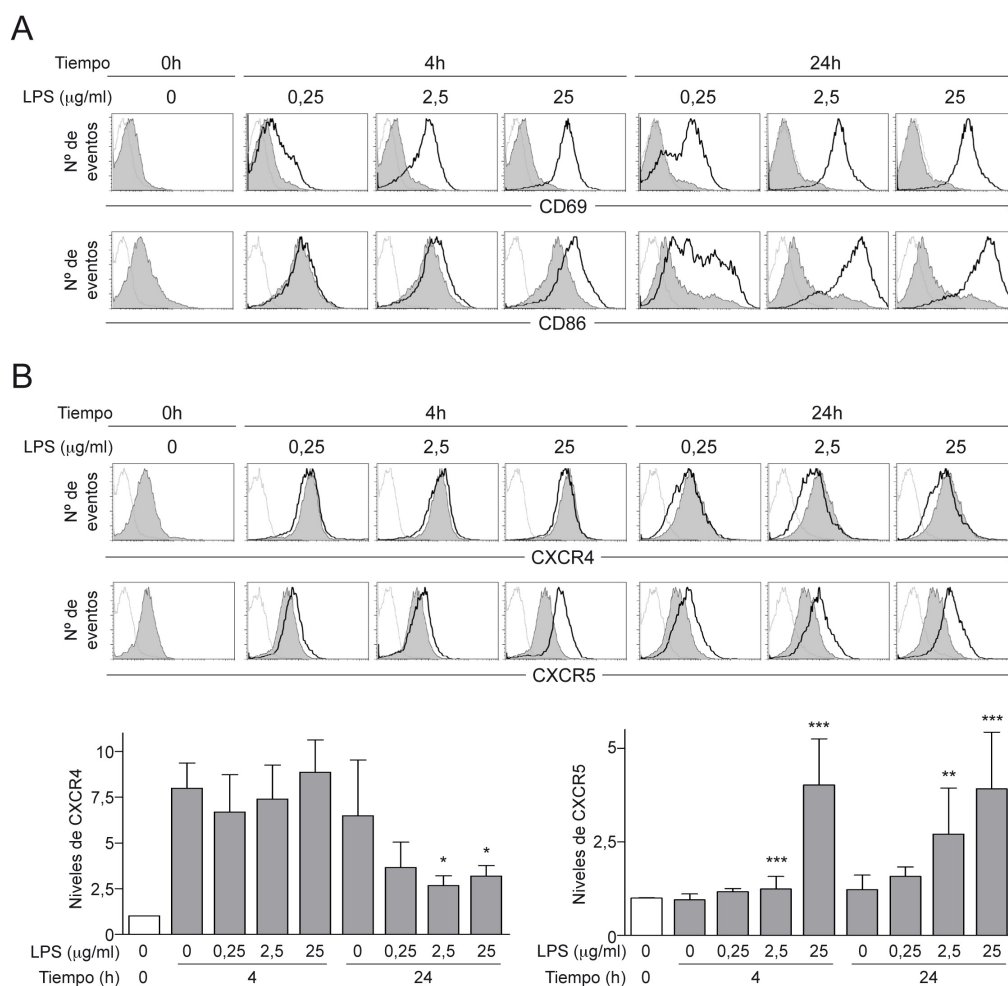


Figura 11. Efecto dosis dependiente de LPS en la activación de las células B

A, Perfiles de expresión para CD69 (paneles superiores) y CD86 (paneles inferiores) en células B recién aisladas (tiempo 0 h) o en cultivo los tiempos indicados en ausencia (gris) o presencia de LPS a las dosis indicadas (línea gruesa negra). **B**, Perfiles de expresión para CXCR4 (paneles superiores) y CXCR5 (paneles inferiores) en células B en iguales condiciones que en A. Parte inferior, cuantificación de los cambios en los niveles de expresión de CXCR4 y CXCR5 relativos al tiempo inicial (tiempo 0 h) en cada condición; los datos corresponden a la media \pm SD (n=3). Perfiles en línea discontinua, controles de isotipo; perfiles en A, B corresponden a un experimento representativo (n=3). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.3. Efectos de la estimulación a través de TLR4 en la migración de células B en respuesta a un gradiente quimiotáctico

Como primer abordaje para el estudio de los efectos de la señalización por TLR4 en la dinámica de las células B, utilizamos el modelo de migración e invasión *in vitro* en respuesta a gradientes de estímulos quimiotácticos, basado en el uso de cámaras de Boyden. Estas cámaras constan de dos espacios conectados por una membrana porosa; el estímulo quimiotáctico se añade en el compartimento inferior, creándose un gradiente hacia el compartimento superior donde se añade la suspensión celular. Transcurrido un tiempo de incubación, se cuantifica por citometría de flujo el número de células que pasan a través de los poros a la cámara inferior guiadas por el

estímulo quimiotáctico. Analizamos la respuesta de las células B a gradientes de las quimioquinas CXCL12, ligando de CXCR4, y CXCL13, ligando de CXCR5, y su posible regulación por la estimulación a través de TLR4.

4.3.1. Migración en respuesta a gradientes de CXCL12

La migración en ausencia de estímulo quimiotáctico (basal) fue baja; la presencia de una dosis óptima de CXCL12 (50 nM) promovió la migración de células B (~ 3%) (Fig. 12A). La presencia de LPS en el ensayo disminuyó significativamente y de manera dosis-dependiente la migración de las células B en respuesta a CXCL12, siendo totalmente abolida a dosis de 25 µg/ml de LPS (Fig. 12A). Debido al papel de CXCL12 en el *homing* de células B a los OLS (Okada *et al.*, 2002), analizamos la expresión de otras moléculas implicadas en dicho proceso tales como L-selectina (CD62L) y el receptor del ácido hialurónico (CD44); ambas son necesarias en las primeras fases de adhesión de los linfocitos al endotelio para la transmigración (DeGrendele *et al.*, 1996). Las células B expresaban en su superficie CD44 y CD62L; la estimulación con LPS (2,5 µg/ml) resultó en una bajada transitoria de los niveles de CD62L, con mínimo observado a 4 h, en una parte de la población, recuperándose prácticamente los niveles iniciales tras 24 h de estimulación (Fig. 12B). Los niveles de CD44 se mantuvieron constantes hasta las 6 h, mostrando un aumento a las 24 h de estimulación con LPS (Fig. 12B). La señalización a través de TLR4 reducía por tanto la migración de células B en respuesta a CXCL12 de manera dependiente de la dosis de LPS y a tiempos tempranos de estimulación.

4.3.2. Migración en respuesta a gradientes de CXCL13

Dosis óptimas de CXCL13 (400 nM) promovieron la migración de las células B (Fig. 13A). La presencia en el ensayo de LPS a dosis de 0,25 y 2,5 µg/ml no alteró la respuesta de las células B a CXCL13; sin embargo, dosis de LPS más elevadas (25 µg/ml) inhibieron completamente la migración (Fig. 13A). La observación previa del aumento en los niveles de CXCR5 tras la estimulación durante 4 h con dosis de LPS que promovían la activación total de las células B, nos llevó a estudiar el efecto de LPS en la migración en esa ventana temporal. Para ello, estimulamos las células B con 2,5 µg/ml de LPS durante 4 h, eliminamos el LPS del medio, y pusimos las células B en las cámaras de Boyden en presencia de CXCL13 a concentraciones de 40 y 400 nM. La migración basal de las células B no se alteró tras las 4 h en cultivo en ausencia o en presencia de LPS (Fig. 13B). La respuesta a gradientes de CXCL13 fue mayor para las células B previamente estimuladas con LPS, siendo el aumento significativo a 400 nM de CXCL13 (Fig. 13B). Los resultados sugerían que dosis muy elevadas de LPS eran necesarias para modular la migración de células B a CXCL13 a tiempos cortos (< 2 h); sin embargo, la exposición a dosis menores durante un tiempo más prolongado (4 h) potenciaba la migración.

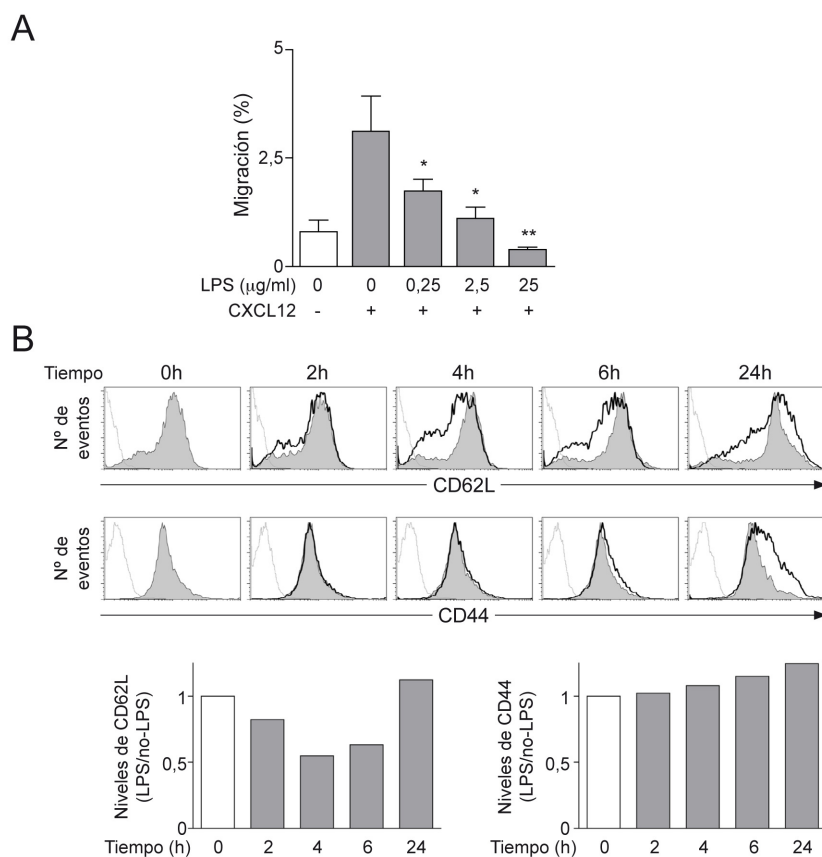


Figura 12. La estimulación con LPS regula la migración a CXCL12 y la expresión de moléculas implicadas en el homing hacia los OLS de células B

A, Frecuencia de migración de células B en respuesta a un gradiente de CXCL12 (50 nM) y en ausencia o presencia de LPS a las dosis indicadas; los datos corresponden a la media \pm SD (n=2). **B**, Perfiles representativos de expresión de CD62L (paneles superiores) y CD44 (paneles inferiores) en células B recién aisladas (tiempo 0 h) o en cultivo en ausencia (gris) o presencia de LPS (2,5 µg/ml; línea negra gruesa) los tiempos indicados. Paneles inferiores, cuantificación de los cambios en los niveles de expresión de CD62L y CD44 en presencia de LPS, relativos a los niveles de expresión en células B no-estimuladas en el mismo tiempo de cultivo. Perfiles en línea discontinua, controles de isotipo; datos mostrados en A, B corresponden a un experimento representativo (n=3). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.4. Efectos de la estimulación por TLR4 en la motilidad de las células B en un modelo de migración en dos dimensiones

En los folículos de los OLS, las células B migran sobre la superficie de una red de células estromales, que presenta CXCL13 en su superficie de manera homogénea, sin formarse gradientes, y en el contexto de moléculas de adhesión como ICAM-1. Para evaluar los efectos de la estimulación por TLR4 en la motilidad de las células B en un sistema experimental más próximo a la situación *in vivo*, empleamos el modelo bidimensional (2D) puesto a punto en nuestro grupo durante el desarrollo de este trabajo y basado en el uso de bicapas lipídicas artificiales planas (Saez de Guinoa *et al.*, 2011). La inclusión en las membranas artificiales de ICAM-1 a densidades fisiológicas (150-300 moléculas/µm²), y su tapizado con CXCL13 de

forma homogénea permite recrear la superficie estromal sobre la cual las células B se mueven *in vivo* de forma aleatoria (*random migration*), obteniéndose valores de velocidad media equivalentes a los descritos *in vivo* por microscopía multifotón.

La combinación de este sistema experimental junto con microscopía confocal en tiempo real, nos permitió monitorizar el comportamiento o dinámica de las células B mediante el estudio de distintos parámetros. En las imágenes obtenidas por DIC, evaluamos la polarización de las células B en el tiempo, estimado como los cambios morfológicos debidos a la emisión de protusiones de membrana (*membrane ruffles*) para la migración. El contacto de la célula B con la membrana artificial, mediado por la interacción LFA-1/ICAM-1, se detectó por IRM; las frecuencias de adhesión (contacto célula B:membrana artificial) y migración (célula que se desplaza sobre la membrana haciendo contacto con la misma) se estimaron mediante IRM y DIC. Por último, el marcaje de las células B con sondas fluorescentes (CFSE, SNARF-1) previo a los ensayos permitió el análisis de distintos parámetros dinámicos (velocidad media, índice de direccionalidad) usando el *software* IMARIS de Bitplane.

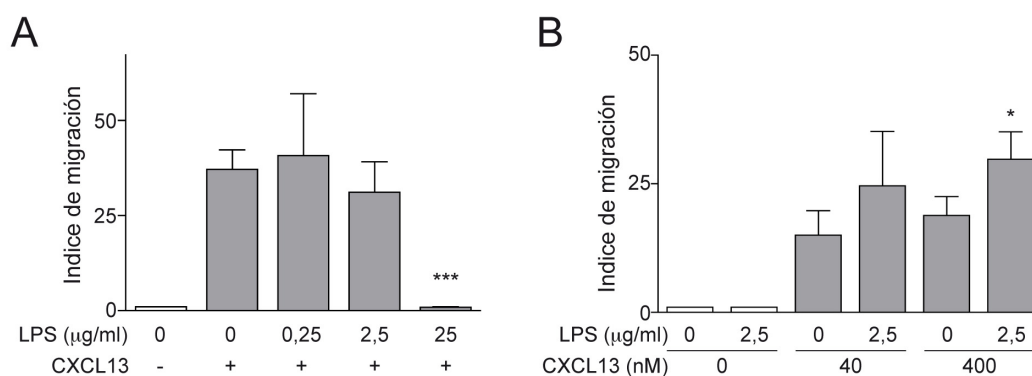


Figura 13. Efecto del LPS en la migración de células B en respuesta a CXCL13

A, Migración de células B, expresada como índice de migración, en respuesta a gradientes de CXCL13 (400 nM) y en presencia de las dosis indicadas de LPS. **B**, Migración de células B, previamente en cultivo en ausencia o presencia de LPS (2,5 µg/ml) durante 4 h, en respuesta a gradientes de CXCL13 (40 nM; 400 nM). Los datos en A, B corresponden a la media \pm SD (n=3). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.4.1. Dinámica de células B en presencia de distintas dosis de LPS

Células B purificadas se marcaron con CFSE, se pusieron en contacto con membranas artificiales que contenían ICAM-1, y fueron monitorizadas durante 60-90 min. En estas condiciones las frecuencias de adhesión, polarización y migración celular fueron muy bajas, y en algunos casos apenas detectables; la presencia de LPS no alteró el valor de estos parámetros (Fig. 14A-B y datos no mostrados). En membranas que contenían ICAM-1 y CXCL13, las células B mostraron altas frecuencias de adhesión (65%), debido a la activación de LFA-1, polarización (80%) y migración (50%) (Fig. 14A-B). La velocidad media de movimiento de las células

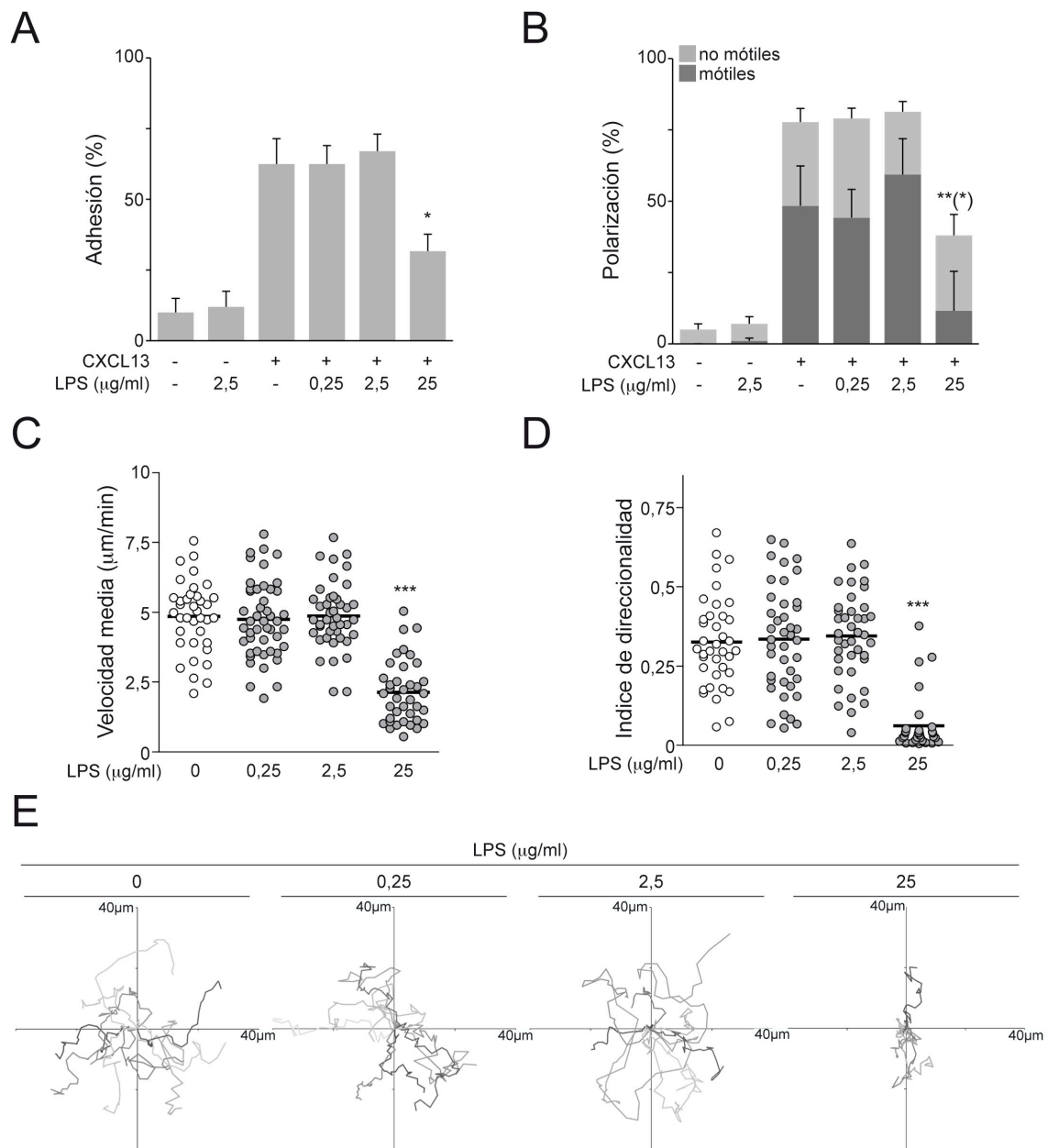


Figura 14. Análisis de la dinámica de células B en presencia de LPS en un modelo 2D

Células B, previamente marcadas con CFSE, se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 (150 moléculas/μm²) y habían sido tapizadas con CXCL13 o no, en ausencia o presencia de LPS a las dosis indicadas. **A**, Frecuencias de adhesión de células B a las membranas y, **B**, frecuencias de polarización, indicando las fracciones de células en movimiento (móviles) en cada caso. **C-E**, Parámetros dinámicos mostrados por las células B en migración sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13 en presencia de las dosis indicadas de LPS; valores de velocidad media (**C**) e índice de direccionalidad (**D**), y trayectorias descritas en células B representativas (n=10) (**E**). Los datos de **A**, **B**, son la media ± SD (n=3); los datos en **C**, **D** corresponden a dos experimentos, cada punto representa a una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

B fue de 5 $\mu\text{m}/\text{min}$, describiendo trayectorias aleatorias, con valores de índice de direccionalidad bajos (~ 0.3) (Fig. 14C-E). La presencia en el medio de LPS a dosis de 0,25 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no modificó ninguno de los parámetros evaluados (Fig. 14A-E; videos 1 y 2). Sin embargo, dosis mayores de LPS disminuyeron a la mitad o incluso más las frecuencias de adhesión, polarización y migración, así como los valores de velocidad media (Fig. 14A-C; video 3); las trayectorias descritas por las células B también se redujeron, describiendo un movimiento más confinado (índice de direccionalidad < 0.1) (Fig. 14D-E). Estos resultados indicaban que sólo la estimulación por TLR4 con altas dosis de LPS era capaz de alterar la dinámica de las células B en respuesta a CXCL13 a tiempos tempranos (< 90 min).

4.4.2. Dinámica de células B tras su estimulación a través de TLR4 durante tiempos cortos (4 h)

Previamente hemos descrito que la exposición durante 4 h de las células B a la dosis mínima de LPS (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) necesaria para activar la totalidad de la población, promovía un pequeño aumento de los niveles de CXCR5 en la membrana, así como potenciaba la respuesta a CXCL13 en cámaras de Boyden. Quisimos analizar los posibles efectos en el comportamiento celular tras la estimulación de las células B con la citada dosis de LPS durante 4 h en el modelo 2D. Para ello, células B recién aisladas se marcaron con sondas fluorescentes (CFSE, SNARF-1), y se pusieron en cultivo en ausencia o presencia de LPS; tras 4 h, se eliminó el LPS del medio, las células B no-estimuladas (SNARF-1) y LPS-estimuladas (CFSE) se mezclaron en ratio 1:1, y se pusieron en contacto con membranas artificiales que contenían ICAM-1 y en ausencia o presencia de CXCL13.

En ausencia de CXCL13, las células B pre-estimuladas a través de TLR4 mostraban una tendencia a incrementar las frecuencias de adhesión y migración, con cambios significativos en polarización (Fig. 15A-B). En respuesta a CXCL13, las células B en cultivo durante 4 h y en ausencia de estímulo se comportaron de manera similar a lo obtenido con células B recién aisladas; las células B LPS-estimuladas presentaron aumentos significativos en todos los parámetros evaluados en comparación a células B no-estimuladas: mayores frecuencias de adhesión, polarización y migración (Fig. 15A-B; video 4). Aunque los valores de velocidad media no se alteraron, el índice de direccionalidad aumentó significativamente tras la estimulación con LPS, detectándose trayectorias más largas (Fig. 15C-E). Estos datos indicaron que una estimulación continuada a través de TLR4 modificaba el comportamiento de las células B en respuesta a CXCL13.

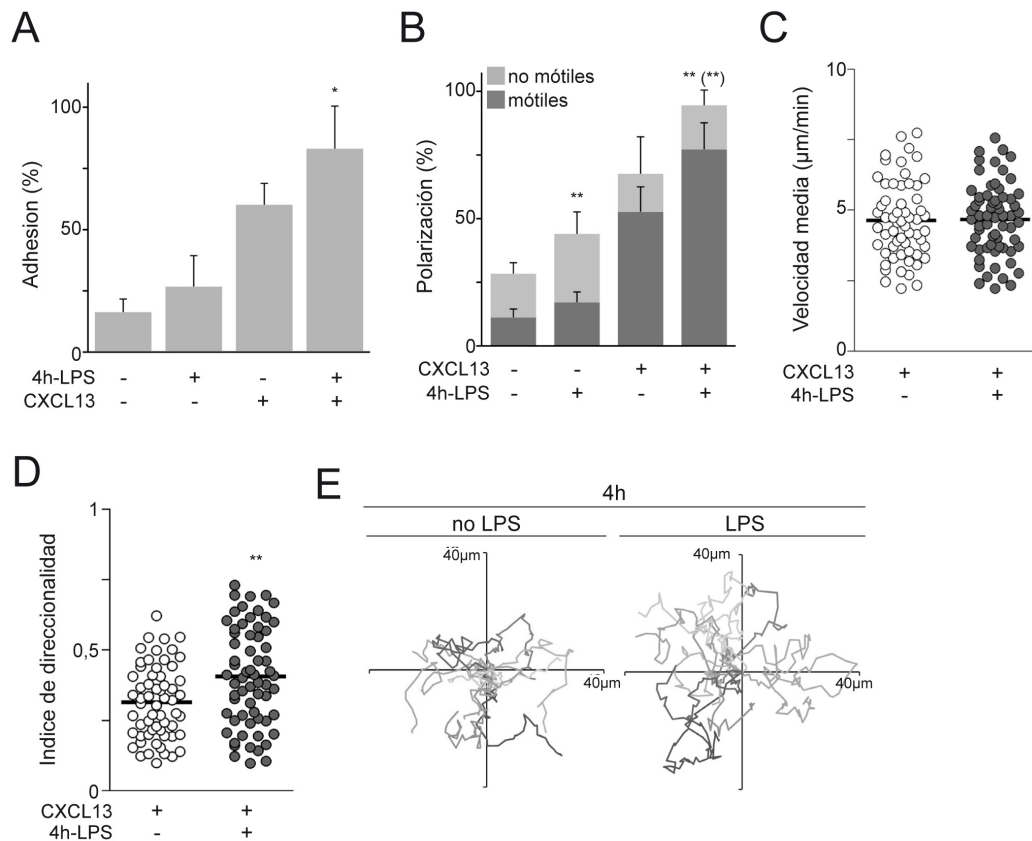


Figura 15. Tiempos cortos de estimulación por TLR4 modulan la dinámica de células B

Células B en cultivo en ausencia o presencia de LPS (2,5 µg/ml) durante 4 h, se lavaron, se mezclaron en ratio 1:1, y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 y habían sido tapizadas o no con CXCL13. **A**, Frecuencias de adhesión y, **B**, frecuencias de polarización, indicando la fracción de células que migran (móviles), de células B en cada condición. **C-E**, Parámetros dinámicos mostrados por las células B en migración sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13, en cada caso; valores de velocidad media (**C**) e índice de direccionalidad (**D**), y trayectorias descritas en células B representativas (n=10) (**E**). Los datos de A, B, son la media ± SD (n=4); los datos en C, D corresponden a tres experimentos, cada punto representa a una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis, análisis de los datos de células móviles.

4.4.3. Dinámica de células B tras su estimulación a través de TLR4 durante tiempos largos (24 h)

Para estudiar si los efectos observados se mantenían o modificaban a tiempos más largos, pusimos células B en cultivo en ausencia o presencia de LPS (2,5 µg/ml) durante 24 h y, de forma similar a la anteriormente descrita, monitorizamos su comportamiento sobre membranas que contenían ICAM-1 y en ausencia o presencia de CXCL13. Observamos que en células B no-estimuladas las frecuencias de adhesión, polarización y migración eran elevadas incluso en ausencia de CXCL13 (Fig. 16A-B); la estimulación con LPS no aumentó significativamente estos parámetros (Fig. 16A-B; video 5). En respuesta a CXCL13, la velocidad de movimiento de las células B no-estimuladas fue alta (~ 7,5 µm/min), describiendo trayectorias más largas, en comparación a lo obtenido con células B recién aisladas (Fig. 16C-E). La exposición a LPS no modificó estos valores de velocidad media; los valores de índice

de direccionalidad fueron similares en ausencia o presencia de LPS (Fig. 16C-E). La activación por LPS durante 24 h sí resultó en un aumento del tamaño celular (10 μm de diámetro, en comparación a 5 μm en células B no-estimuladas) en una parte de la población de células B (60%; Fig. 16F), posiblemente debido a la señal proliferativa de LPS en células B. Por tanto, períodos largos de cultivo (24 h) resultaron en la alteración de la dinámica de las células B *per se*, en ausencia de activación detectable (CD86^{low} CD69^- , datos no mostrados); es posible que la muerte celular que ocurría en el cultivo promoviera estos cambios. En este contexto experimental, no detectamos cambios significativos adicionales debidos a la estimulación a través de TLR4 durante 24 h.

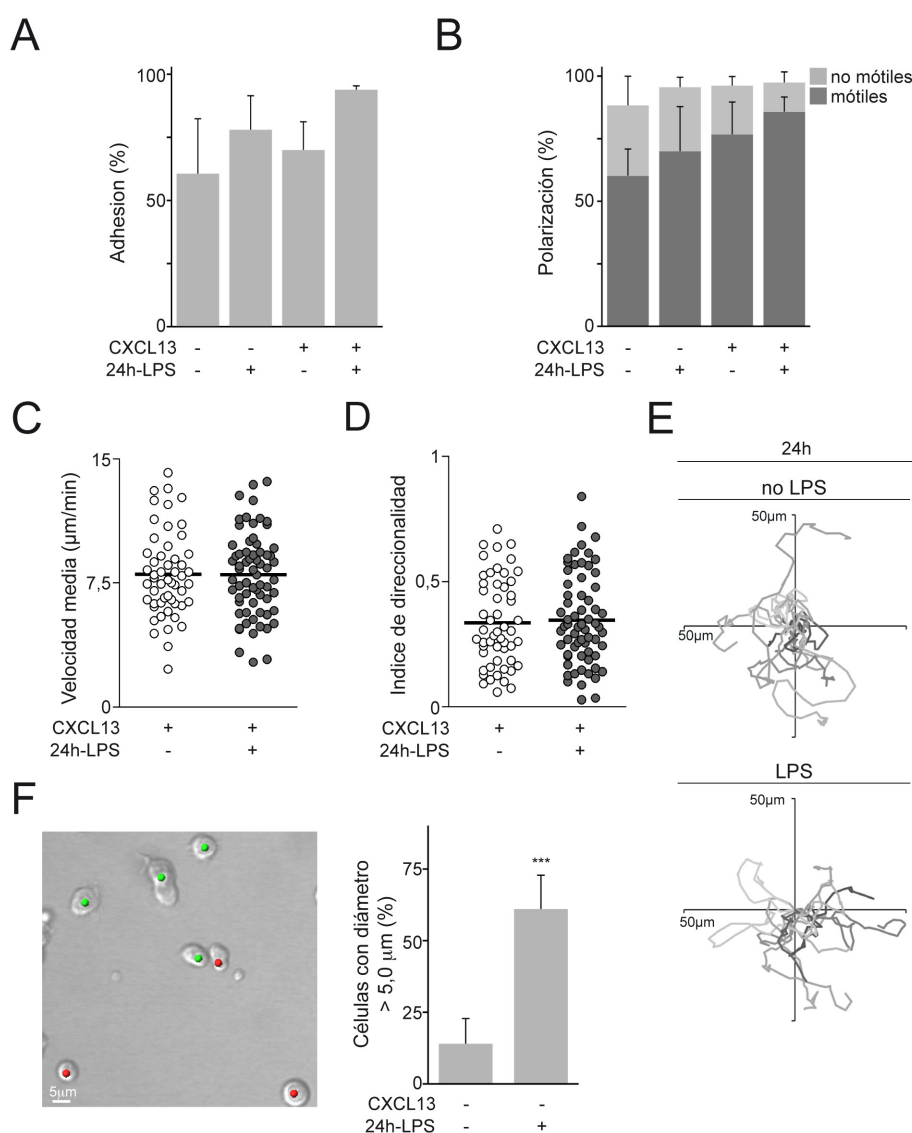


Figura 16. Efectos de tiempos largos de estimulación por TLR4 en el comportamiento de células B

Células B en cultivo en ausencia o presencia de LPS (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 h, se lavaron, se mezclaron en ratio 1:1, y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 y habían sido tapizadas o no con CXCL13. **A**, Frecuencias de adhesión y, **B**, frecuencias de polarización, indicando la fracción de células que migran (móviles), de células B en cada condición. C-E, Parámetros dinámicos mostrados por las células B en migración sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13, en

4.5. TLR4 regula la adhesión mediada por LFA-1/ICAM-1

El aumento en las frecuencias de adhesión y migración que observamos tras 4 h de exposición a LPS y en respuesta a CXCL13 (Fig. 15A-B), indicaba que TLR4 modulaba la activación de LFA-1. Mediante un análisis más profundo de las imágenes obtenidas por IRM en tiempo real, observamos que las áreas de contacto entre la célula B y la membrana artificial eran más pequeñas en aquellas que fueron pre-estimuladas con LPS (Fig. 17A-B). Medimos la intensidad de la señal de IRM, que refleja la fuerza de la interacción entre LFA-1 y ICAM-1; los valores obtenidos en células pre-estimuladas a través de TLR4 fueron significativamente menores a los de células B no-estimuladas (Fig. 17B). Estos datos sugerían que la estimulación a través de TLR4 durante un tiempo corto (4 h) modulaba la afinidad y/o la avidéz con la que LFA-1 interaccionaba con ICAM-1, reduciendo así la fuerza y/o estabilidad del contacto que la célula B establecía con la superficie sobre la que se desplazaba.

4.6. Modulación de la respuesta a CCL21 por la señalización vía TLR4

Tras el reconocimiento de antígeno y activación a través del BCR, las células B inician un programa de migración que las dirige hacia el paracórtex de los OLS, donde presentan antígeno a las células T y, a su vez, reciben señales co-estimuladoras. Este cambio de localización está mediado principalmente por CCL21 y su receptor CCR7 (Reif *et al.*, 2002). Analizamos si la estimulación por TLR4 regulaba la respuesta de las células B a CCL21, y ello pudiera facilitar la migración de las células B al paracórtex en ausencia de señal antigénica. Primero, monitorizamos los niveles de expresión de CCR7 tras la estimulación con LPS (2,5 µg/ml); CCR7 aumentó levemente sus niveles en la superficie de las células B a las 24 h de estimulación (Fig. 18A). Los niveles de expresión de moléculas asociadas a la presentación de antígeno a la célula T (MHC de clase II) y co-estimulación (CD40) también incrementaron de manera significativa a las 24 h (Fig. 18B). Utilizando los ensayos en cámaras de Boyden, evaluamos si la migración de las células B en respuesta a distintas dosis de CCL21 (10 nM; 100 nM) se modificaba tras la estimulación con LPS durante 4 h, tiempo al cual habíamos detectado cambios en la respuesta a CXCL13. La migración a CCL21 fue más elevada en células B tras 4 h en cultivo en comparación a células B recién purificadas (Fig. 18C). Además, células B expuestas a LPS mostraron una mayor capacidad de migración a CCL21 que las no-expuestas a LPS (Fig. 18C).

cada caso; valores de velocidad media (**C**) e índice de direccionalidad (**D**), y trayectorias descritas en células B representativas (n=10) (**E**). **F**, Imagen representativa (izquierda; células verdes, LPS-estimuladas; células rojas, no-estimuladas) y cuantificación de la frecuencia de células B con un diámetro mayor de 5,0 µm en cada condición (derecha). Los datos de A, B, son la media ± SD (n=2); los datos en C, D corresponden a dos experimentos, cada punto representa a una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

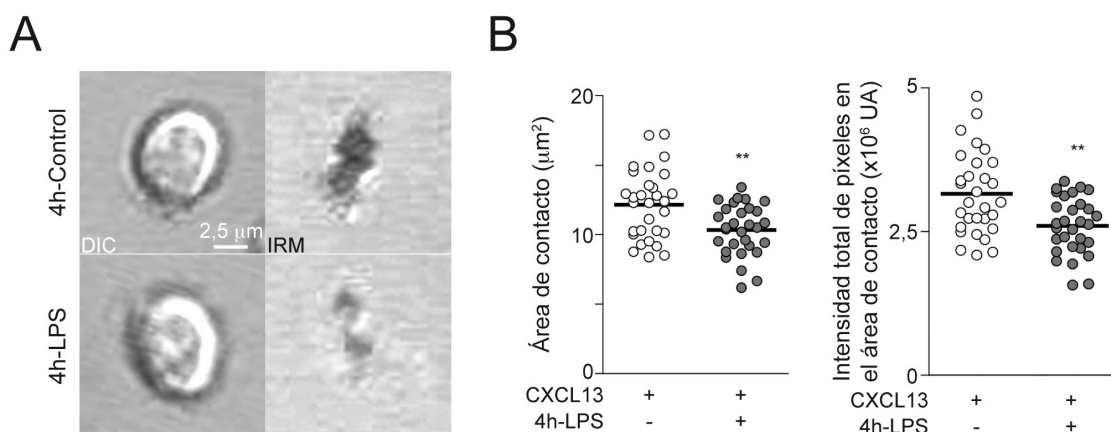


Figura 17. La señalización por TLR4 regula el contacto de las células B con la membrana mediado por LFA-1/ICAM-1

A, Imágenes de DIC e IRM de células B no-estimuladas o LPS-estimuladas (4 h) representativas en contacto con membranas que contienen ICAM-1 y CXCL13. **B**, Cuantificación del área de contacto (izquierda) e intensidad total de píxeles en el contacto (derecha) de la célula B con la membrana artificial; cada punto representa la media del área de contacto, o del valor de intensidad, para una célula a lo largo del tiempo. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo (n=4). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

Realizamos ensayos de migración en el modelo 2D en presencia de CCL21. La respuesta de adhesión, polarización y migración de las células B recién aisladas (tiempo 0 h) fue menor para CCL21 en comparación a lo previamente observado para CXCL13 (Fig. 19A-B); los valores de velocidad media también resultaron inferiores ($\sim 3 \mu\text{m}/\text{min}$; Fig. 19C). Para evaluar los posibles efectos de la señalización a través de TLR4, dejamos las células B en cultivo en ausencia o presencia de LPS (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 4 h, y a continuación monitorizamos su comportamiento sobre las membranas tapizadas con CCL21. La respuesta a CCL21 de las células B no-estimuladas fue mayor en polarización y migración que a tiempo 0 h; la estimulación con LPS resultó en frecuencias de adhesión, polarización y migración aún mayores (Fig. 19A-B). Los valores de velocidad media e índice de direccionalidad fueron similares para células B no-estimuladas y LPS-estimuladas (Fig. 19C-D).

Por tanto, la estimulación a través de TLR4 potenciaba la respuesta de las células B a CCL21 en los dos modelos experimentales utilizados; sin embargo, no aumentó la direccionalidad de las células B.

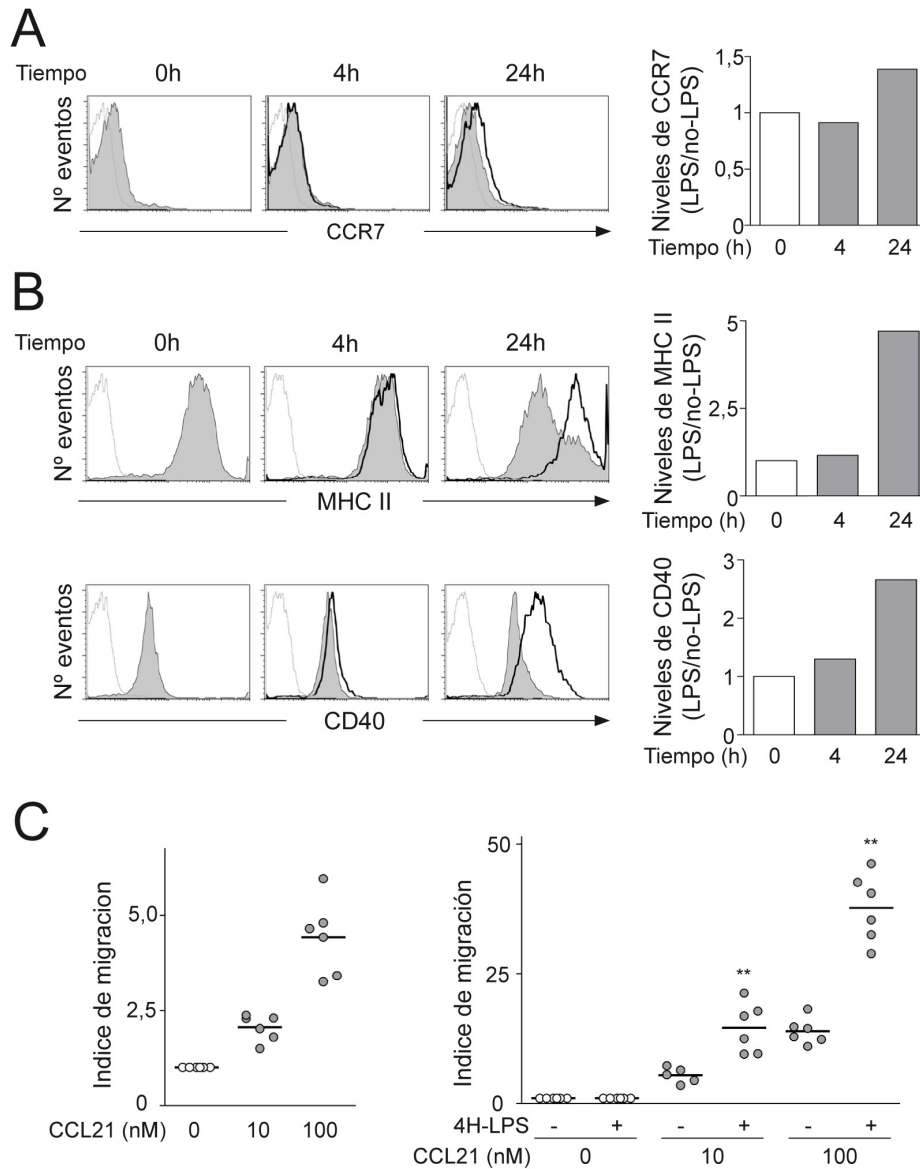


Figura 18. Efectos de la señalización por TLR4 en la respuesta a CCL21

A, Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de CCR7 en células B recién aisladas (tiempo 0 h) o tras su cultivo en ausencia (gris) o presencia de LPS (2,5 µg/ml; línea negra gruesa) los tiempos indicados. Panel derecho, cuantificación de la variación en los niveles de CCR7 por LPS, relativos a células B en ausencia de LPS, para cada tiempo. **B**, Igual que en A, pero para MHC-II y CD40. **C**, Migración de células B recién aisladas (izquierda) o tras su cultivo 4 h en ausencia o presencia de LPS (2,5 µg/ml), en respuesta a gradientes de CCL21 (10 nM; 100 nM). Perfiles de línea discontinua, controles de isotipo. Datos en A, B corresponden a un experimento representativo (n=3); datos en C, cada punto es un experimento. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

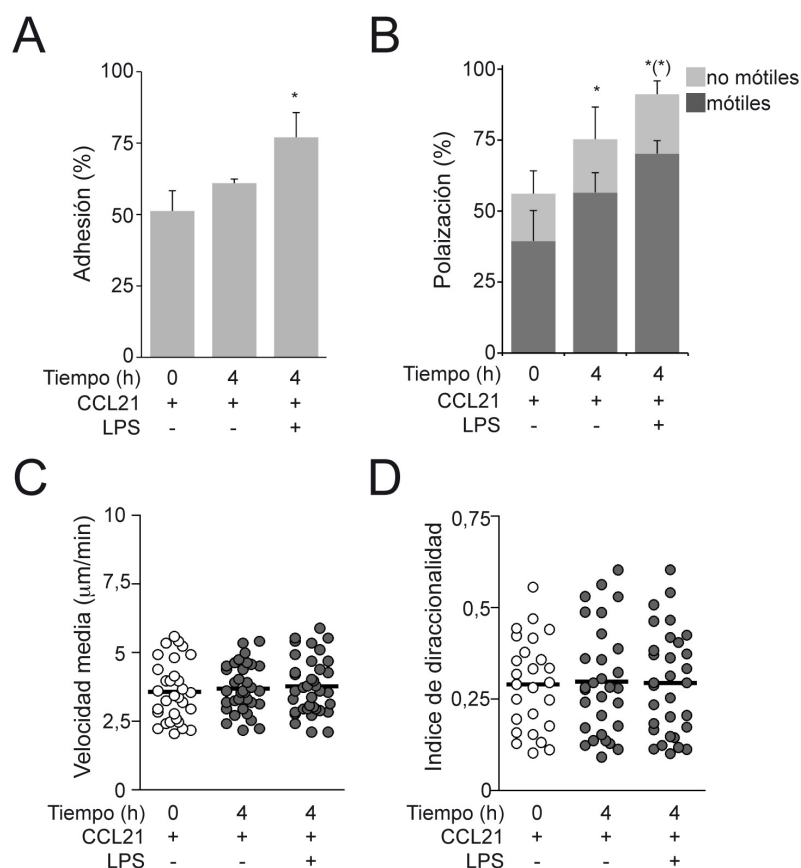


Figura 19. Efectos de la señalización por TLR4 en la dinámica de células B en presencia de CCL21 en el modelo 2D

Células B recién purificadas o tras su cultivo 4 h en ausencia o presencia de LPS (2,5 μg/ml), se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 y CCL21. **A**, Frecuencias de adhesión y, **B**, frecuencias de polarización, indicando la fracción de células que migran (móviles), de células B en cada condición. **C-D**, Parámetros dinámicos mostrados por las células B en migración sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13, en cada caso; valores de velocidad media (**C**) e índice de direccionalidad (**D**). Datos en A, B son la media ± SD (n=4); los datos en C, D corresponden a un experimento representativo (n=4), donde cada punto es una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

4.7. Rutas de señalización implicadas en los cambios de comportamiento celular mediados por TLR4 a tiempos cortos

TLR4 señala a través de dos rutas principales mediadas por moléculas adaptadoras diferentes: MyD88 y TRIF. Quisimos estudiar la implicación de ambas rutas en los efectos descritos de TLR4 sobre la dinámica de las células B. Para ello, utilizamos en los ensayos células B aisladas de bazos de ratones deficientes en MyD88 (MyD88^{-/-}) o en TRIF (TRIF^{-/-}) y, como control, células B purificadas de bazos de ratones WT con igual fondo genético (C57BL/6) y provenientes de la misma celda de animalario. En adelante en este trabajo, utilizamos LPS a la mínima dosis que activaba el total de las células B y que promovía cambios en dinámica a las 4 h de estimulación (2,5 μg/ml).

4.7.1. Implicación de la ruta de MyD88

Células B WT y MyD88^{-/-} se pusieron en cultivo en ausencia o presencia de LPS durante 4 h. El análisis de los niveles de expresión de CD86 y CD69 por citometría de flujo mostró la deficiencia de las células B MyD88^{-/-} para activarse por TLR4 (Fig. 20A). En los ensayos realizados en cámaras de Boyden, y a diferencia de las WT, las células B MyD88^{-/-} estimuladas con LPS no aumentaron su migración en presencia de gradientes de CCL21 (Fig. 20B).

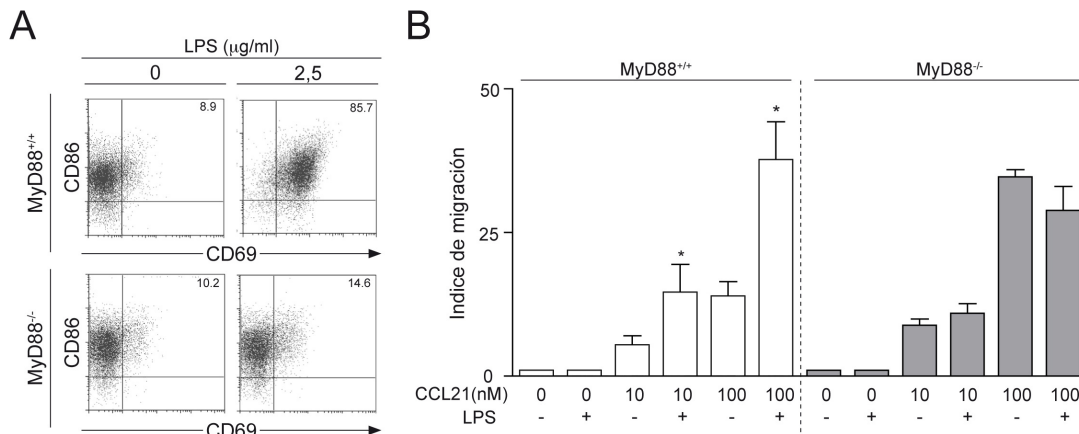


Figura 20. La ruta de MyD88 está implicada en los efectos de TLR4 sobre la respuesta quimiotáctica de células B

A, Diagramas de dispersión para los niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B WT (MyD88^{+/+}) y MyD88^{-/-} no-estimuladas (0) y LPS-estimuladas (2,5 µg/ml), 4 h. Se muestra un experimento representativo. **B**, Migración de células B MyD88^{+/+} y MyD88^{-/-}, tras 4 h en cultivo en las condiciones especificadas en A, en respuesta a distintos gradientes de CCL21 (10 nM; 100 nM); los datos corresponden a la media ± SD (n=2). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

Caracterizamos el comportamiento de las células B MyD88^{-/-} en el modelo 2D; para ello, marcamos células B WT y MyD88^{-/-} con sondas fluorescentes diferentes (CFSE, SNARF-1), las estimulamos o no, y las mezclamos en ratio 1:1 inmediatamente antes del ensayo. El comportamiento de las células B MyD88^{-/-} en respuesta a CXCL13 fue similar al de células B WT en todos los parámetros analizados (Fig. 21). Sin embargo, el aumento en adhesión, polarización y migración, así como en direccionalidad mediado por la estimulación con LPS y detectado en las células B WT, no se observó en las células B MyD88^{-/-} (Fig. 21; video 6). El conjunto de los datos indicaba por tanto que la ruta de MyD88 estaba implicada.

4.7.2. Implicación de la ruta de TRIF

De manera similar, estudiamos el papel de la ruta de TRIF. La activación de las células B TRIF^{-/-} tras 4 h de estimulación con LPS fue próxima a la observada para células B WT (Fig. 22A). En presencia de un gradiente de CXCL13, las células B

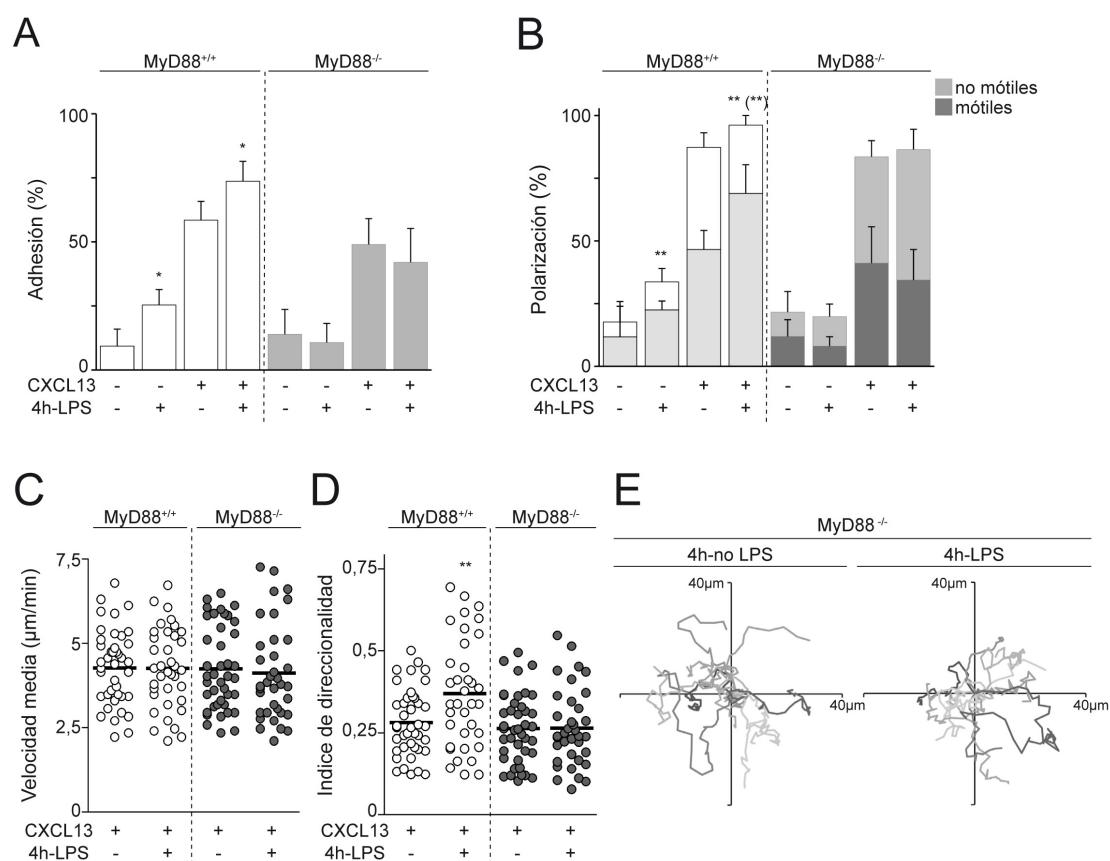


Figura 21. Participación de la ruta de MyD88 en la regulación de la dinámica de células B por TLR4 en el modelo 2D

Células B WT (MyD88^{+/+}) y MyD88^{-/-}, previamente marcadas con sondas fluorescentes (CFSE, SNARF-1) y puestas en cultivo durante 4 h en ausencia o presencia de LPS, se mezclaron en ratio 1:1 y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1, sin o con CXCL13. **A**, Frecuencias de adhesión y, **B**, frecuencia de polarización, indicando la fracción de células que se mueven (móviles), de células B en cada condición. **C**, Valores de velocidad media e, **D**, índice de direccionalidad, y **E**, trayectorias de células representativas (n=10), de células B en migración sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13. Los datos en A, B son la media \pm SD (n=3); los datos en C, D corresponden a tres experimentos, cada punto representa una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

TRIF^{-/-} estimuladas con LPS presentaron una respuesta más elevada que las TRIF^{-/-} no-estimuladas; sin embargo, el aumento fue significativamente menor al obtenido con células B WT (Fig. 22B).

En los ensayos realizados sobre las membranas artificiales, las células B TRIF^{-/-} mostraron una dinámica celular análoga a la de células B WT (Fig. 23). La estimulación con LPS tuvo efectos similares y comparables en células B TRIF^{-/-} y células B WT en respuesta a CXCL13; aumentaron las frecuencias de adhesión, polarización y migración, así como los valores de índice de direccionalidad (Fig. 23; video 7). Estos resultados indicaban que la vía dependiente de TRIF no tenía un papel crucial en los efectos de TLR4 observados.

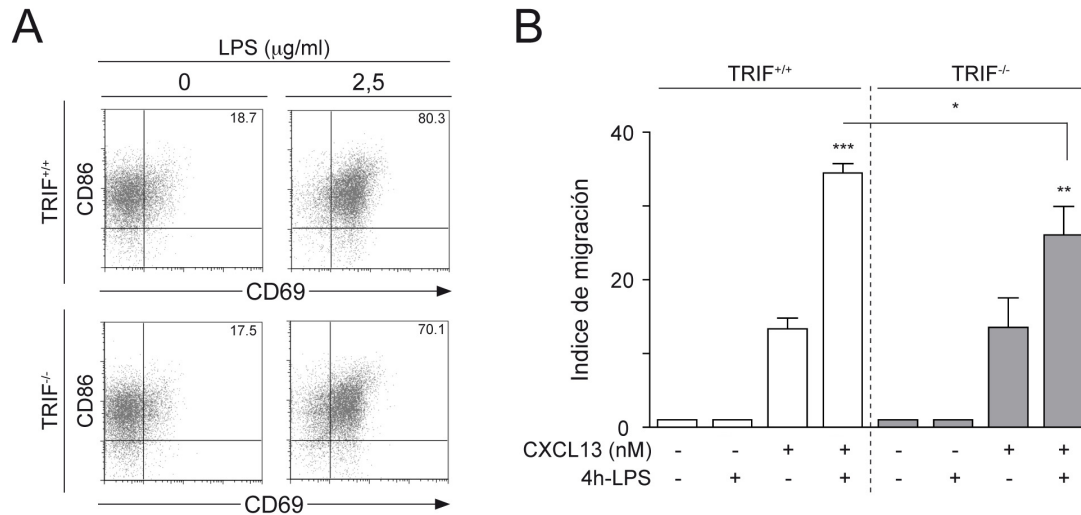


Figura 22. Implicación de la ruta de TRIF en los efectos mediados por TLR4

A, Diagramas de dispersión para los niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B WT (TRIF^{+/+}) y TRIF^{-/-} no-estimuladas (0) y LPS-estimuladas (2,5 µg/ml), 4 h. Se muestra un experimento representativo. **B**, Migración de células B TRIF^{+/+} y TRIF^{-/-}, tras 4 h en cultivo en las condiciones especificadas en A, en respuesta a gradientes de CXCL13 (400 nM); los datos corresponden a la media ± SD (n=2). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.8. Papel de las MAPK en los cambios en dinámica celular mediados por TLR4

Las MAPK son una familia de Ser/Thr quinasas compuesta por tres subfamilias principales, ERK, JNK y p38, que forman un núcleo importante en las cascadas de señalización de todas las células eucariotas. Los TLR activan MAPK, tanto por la vía dependiente de MyD88 como por la de TRIF (Kawai *and* Akira, 2010). Estudiamos si la activación de MAPK por TLR4 era necesaria para modular la dinámica de las células B.

4.8.1. Implicación de ERK1/2 en la ruta de TLR4 en células B

ERK1/2 regulan migración (Huang *et al.*, 2004); recientemente, se les ha atribuido un papel en la formación del lamelipodio como activadoras del complejo de WAVE-2 (Mendoza *et al.*, 2011). Dado que la estimulación a través de TLR4 causaba un aumento en la polarización y migración de las células B, evaluamos si la activación de ERK1/2 era necesaria para ello. Primero, realizamos una cinética de estimulación con LPS a tiempos cortos (0 a 60 min) en células B, y analizamos la cantidad relativa de la forma activa de ERK1/2 (proteínas fosforiladas, p-ERK1/2) respecto de la cantidad total de ERK1/2 mediante western-blot. Observamos un aumento significativo de p-ERK1 a 5 min, con un máximo a los 15 min; a los 60 min, p-ERK1 apenas era detectable. ERK2 también se activó en respuesta a LPS, con una cinética algo diferente a la de ERK1 (Fig. 24A). Con el fin de interferir con la actividad de

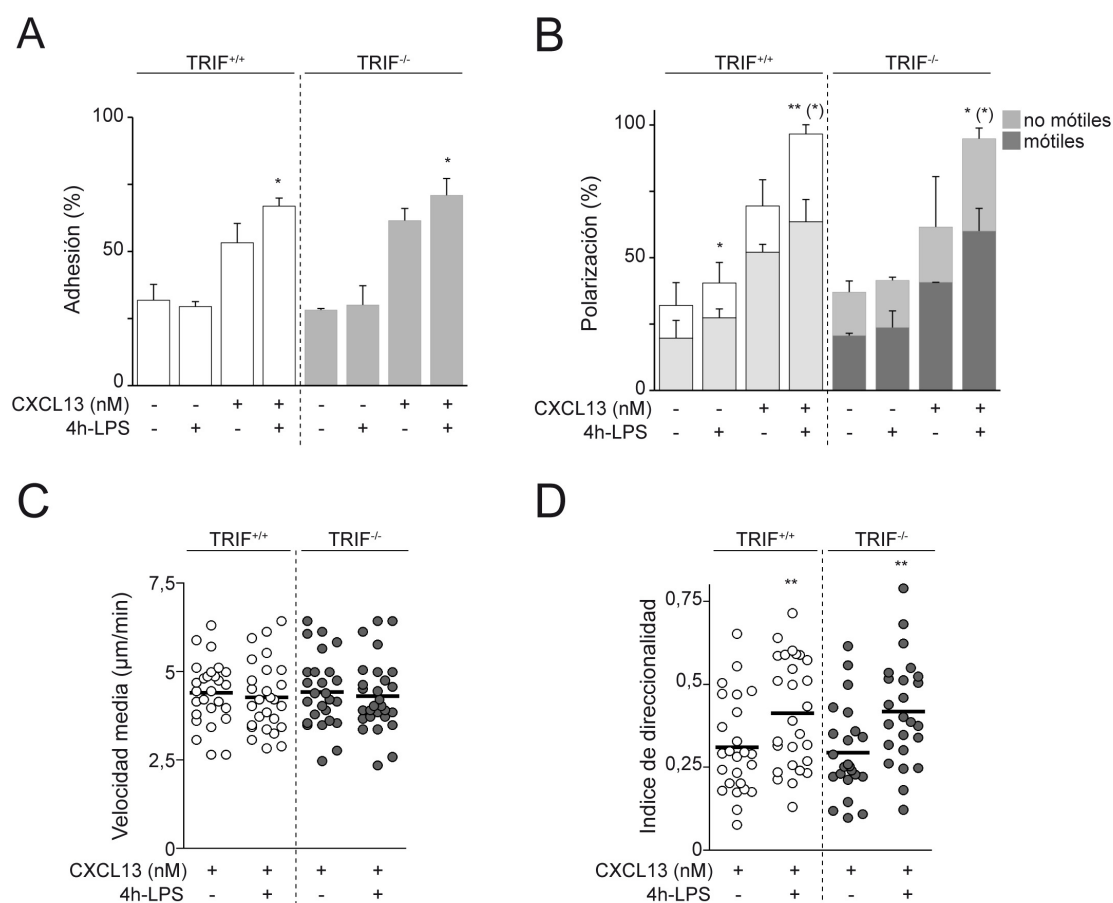


Figura 23. La ruta de TRIF no participa en los efectos de TLR4 en la dinámica de células B

Células B TRIF^{+/+} y TRIF^{-/-}, previamente marcadas con sondas fluorescentes (CFSE, SNARF-1) y puestas en cultivo durante 4 h en ausencia o presencia de LPS, se mezclaron en ratio 1:1 y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1, sin o con CXCL13. **A**, Frecuencias de adhesión y, **B**, frecuencia de polarización, indicando la fracción de células que se mueven (móviles), de células B en cada condición. **C**, Valores de velocidad media e, **D**, índice de direccionalidad de células B en migración sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13. Los datos en A, B son la media \pm SD (n=2); los datos en C, D corresponden a un experimento representativo (n=2), cada punto representa una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

ERK1/2, utilizamos el inhibidor químico reversible y específico de MEK1/2 (quinasa activadora de ERK1/2) PD184352 (PD); dosis de 0,2 μ M de PD bloquearon completamente la fosforilación de ERK1/2, y por tanto su activación, por TLR4 (Fig. 24A). Analizamos la activación de las células B por LPS tras 4 h de cultivo, en ausencia y presencia de la misma dosis del inhibidor; PD no alteró los niveles de expresión de CD69 y CD86 (Fig. 24B). El aumento en los niveles de CXCR5 mediado por LPS tampoco resultó afectado por la inhibición de ERK1/2 (Fig. 24C).

Investigamos si la inhibición de ERK1/2 alteraba los efectos del LPS en la migración de las células B. Células B no-estimuladas o estimuladas con LPS, y en ausencia o presencia de PD, durante 4 h, se lavaron con objeto de eliminar el LPS y/o el PD del medio, y se pusieron en contacto con gradientes de CXCL13 en cámaras de Boyden. Observamos que la respuesta de migración de células B

no-estimuladas fue significativamente inferior en aquellas que habían estado en cultivo en presencia de PD, lo cual indicaba que el inhibidor estaba interfiriendo con la activación de ERK1/2 a través de CXCR5; el lavado previo no había sido suficiente para su total eliminación. A pesar de ello, el aumento significativo de la migración debido a la estimulación con LPS se detectó y fue comparable entre células B no-tratadas y tratadas con PD (Fig. 24D). Ello sugería que la activación de ERK1/2 no estaba implicada en los efectos de LPS sobre la migración de células B en este modelo experimental; sin embargo, ERK1/2 sí era importante para la migración de las células en respuesta a CXCL13.

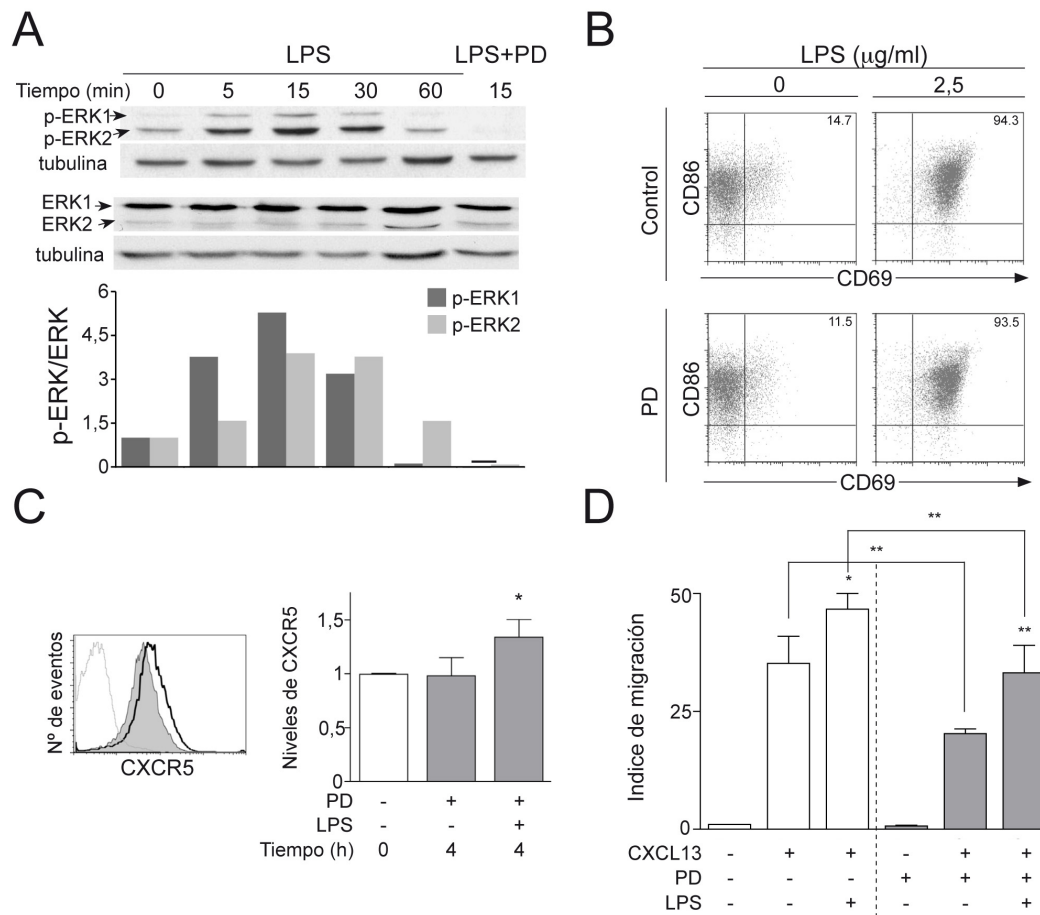


Figura 24. Participación de ERK1/2 en la señalización por TLR4 responsable de sus efectos en dinámica de células B (Parte I)

A. Niveles de proteína p-ERK1/2 y ERK1/2 en células B WT tras su estimulación con LPS (2,5 μg/ml), en ausencia o presencia del inhibidor PD (0,2 μM), los tiempos indicados. Panel inferior, cuantificación de los niveles de p-ERK1/2 respecto de la cantidad de ERK1/2 a cada tiempo. Se muestra un experimento representativo; tubulina, control de carga. **B-D.** Células B se pusieron en cultivo durante 4 h en ausencia o presencia de LPS y/o PD; a continuación, se lavaron y analizaron por citometría de flujo (**B** y **C**) o se utilizaron en ensayos de cámaras de Boyden (**D**). **B.** Niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B tras 4 h en cultivo en las condiciones indicadas. **C.** Perfil de los niveles de expresión de CXCR5 en células B tras 4 h en cultivo con PD, y ausencia (gris) o presencia de LPS (línea negra gruesa). Panel derecho, cuantificación de la variación en los niveles de CXCR5 por LPS y/o PD, relativos a células B recién aisladas (tiempo 0 h); los datos corresponden a la media ± SD (n=4). **D.** Migración de células B, tras 4 h en cultivo en las condiciones indicadas, en respuesta a gradientes de CXCL13 (400 nM); los datos corresponden a la media ± SD (n=2). Perfil de línea discontinua, control de isotipo. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.8.2. Papel de ERK1/2 en los cambios en dinámica celular por TLR4 en el modelo 2D. Puesta a punto de un sistema para la inhibición de ERK durante la estimulación de LPS sin afectar a la migración en respuesta a CXCL13

Para el estudio del papel de ERK1/2 en los cambios en dinámica por TLR4 en células B en el modelo 2D, pusimos a punto un protocolo que nos permitiera bloquear la activación de ERK1/2 mediada por TLR4 sin interferir con la posterior activación de ERK1/2 por CXCR5. La activación de ERK1/2 a través de TLR4 ocurría en los primeros 30 min (Fig. 24A). Observamos que la estimulación de las células B con LPS durante 1 h, seguido de 3 h más de cultivo en ausencia de LPS, aunque no resultaba en los mismos niveles de activación celular (Fig. 25A), sí era suficiente para producir los cambios en comportamiento observados a 4 h: aumento en las frecuencias de adhesión, polarización y migración en respuesta a CXCL13, así como aumento de la direccionalidad del movimiento (Fig. 25B-E). Estos datos además sugerían que 1 h de exposición al ligando de TLR4 era suficiente para activar las rutas de señalización implicadas en los cambios en dinámica de las células B, pero teniendo en cuenta datos previos de esta tesis, se requería un tiempo adicional (3 h) para trasladar esas señales hasta los efectores de la motilidad en células B.

Aplicamos este nuevo protocolo al tratamiento con PD de las células B: 1 h de exposición al inhibidor, lavado extensivo para su eliminación del medio, 3 h de cultivo, y ensayo en el modelo 2D en presencia de CXCL13. Las células B tratadas con PD se comportaron de manera similar a las no-tratadas, con frecuencias de polarización y migración equivalentes, y valores de velocidad e índice de direccionalidad normales (Fig. 26B-C). Por tanto, mediante este tratamiento con PD no se alteraba la respuesta posterior de células B a CXCL13. Realizamos experimentos similares, pero esta vez estimulando las células B con LPS en ausencia o presencia de PD. Los niveles de activación fueron comparables entre células B tratadas y no-tratadas con PD (Fig. 26A). La inhibición de la activación de ERK1/2 por TLR4 no bloqueó los efectos en dinámica; el aumento en las frecuencias de polarización, migración y en el índice de direccionalidad seguían produciéndose (Fig. 26B-C). Ello indicaba que ERK1/2 no estaba implicada en la ruta de señalización activada por TLR4 que media los efectos en motilidad.

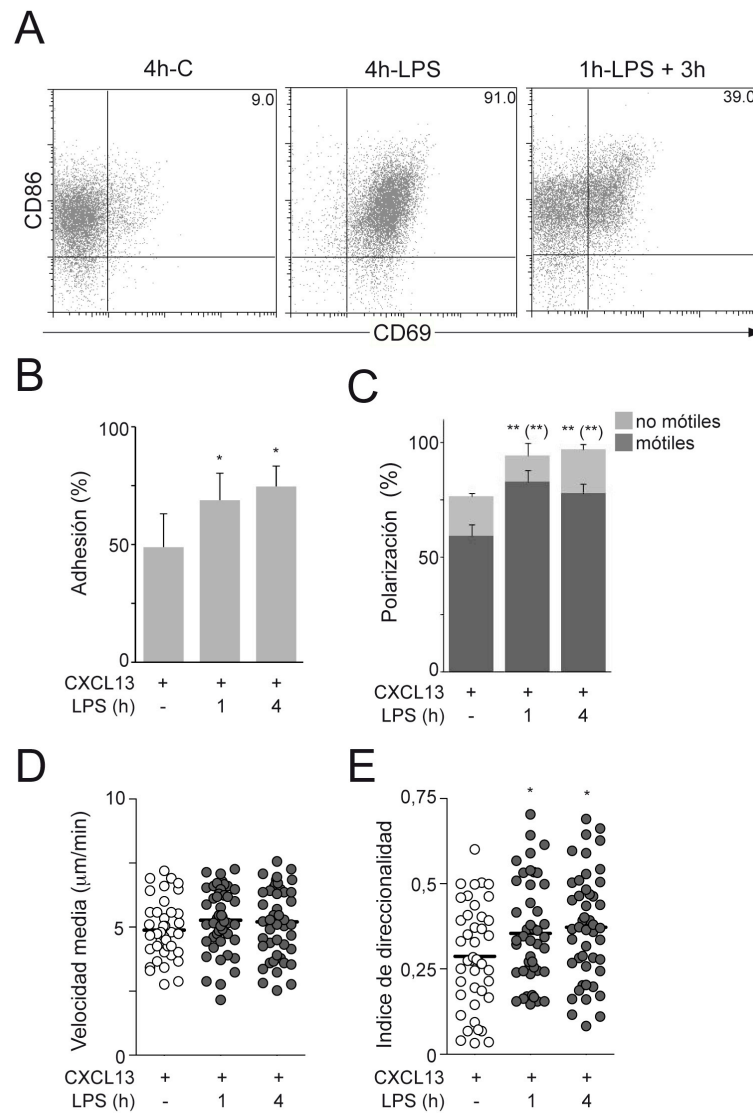


Figura 25. Puesta a punto de un sistema para inhibir la activación de ERK por LPS/TLR4, sin afectar su activación posterior por CXCL13/CXCR5

Comparación de los efectos en células B de la estimulación por TLR4 durante 4 h en comparación a 1 h de estimulación seguida de 3 h más de cultivo en ausencia de estímulo. **A**, Niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B tras su cultivo en ausencia de estímulo (4 h), en presencia de LPS durante 4 h (4h-LPS), o en presencia de LPS durante 1 h seguido de 3 h sin estímulo (1h-LPS+3h). **B**, Frecuencias de adhesión y **C**, frecuencias de polarización, indicando la fracción de células B en movimiento (móviles), de células B en contacto con membranas que contienen ICAM-1 y CXCL13, previamente tratadas como se describe en A. **D**, Valores de velocidad media e **E**, índice de direccionalidad (derecha) de las células B migrando en B, y previamente en cultivo en las condiciones especificadas en A. Datos mostrados en B, C corresponden a la media \pm SD ($n=2$); datos en D, E corresponden a dos experimentos, cada punto es una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

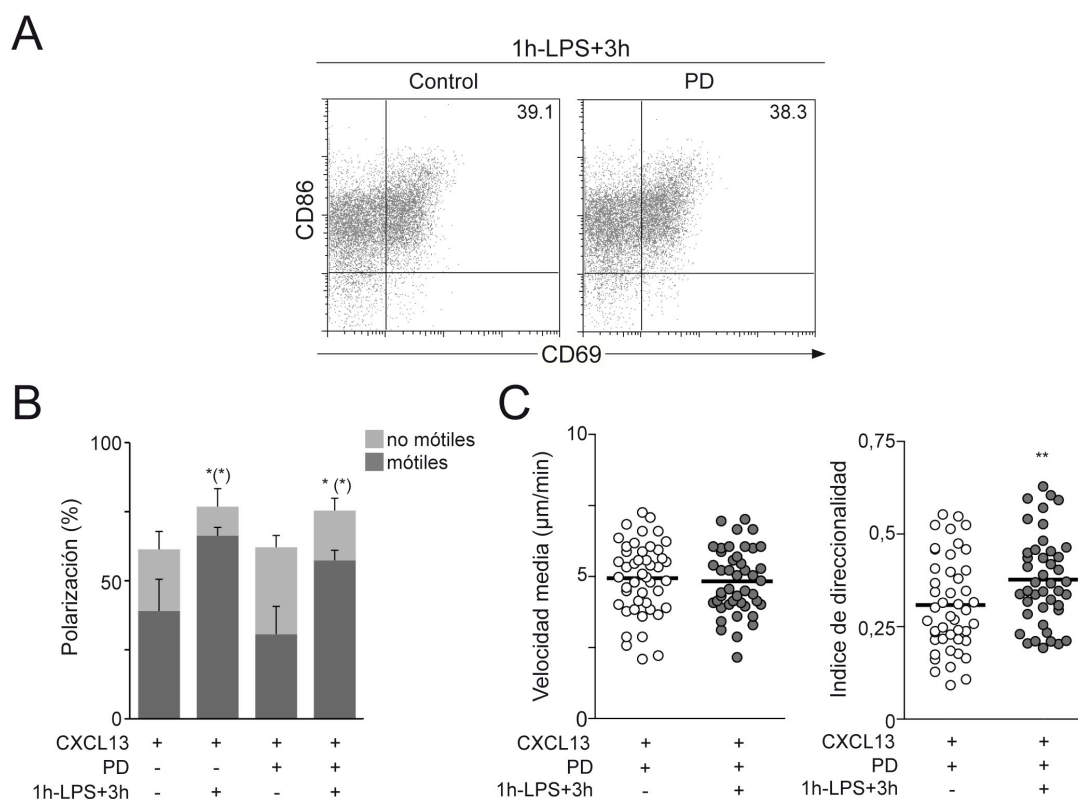


Figura 26. Participación de ERK1/2 en la señalización por TLR4 responsable de sus efectos en dinámica de células B (Parte II)

Células B se pusieron en cultivo durante 1 h en ausencia o presencia de LPS y/o el inhibidor PD, se lavaron y se dejaron en cultivo 3 h más en ausencia de LPS/PD; a continuación se recogieron y utilizaron para los ensayos pertinentes. **A**, Niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B tras su cultivo en las condiciones indicadas. **B**, Frecuencias de polarización, indicando la fracción de células en migración (móviles), de células B sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13, en cada caso. **C**, Valores de velocidad media (izquierda) e índice de direccionalidad (derecha) de células B en migración en B, tras las condiciones de cultivo indicadas. Datos mostrados en B son la media \pm SD de las réplicas de un experimento representativo; datos en C son de un experimento representativo ($n=3$), cada punto es una célula. Estadística en paréntesis, corresponde al análisis estadístico de los datos de células móviles. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

4.8.3. Participación de p38 α en la ruta de señalización de TLR4

Las p38 MAPK, principalmente la isoforma p38 α , ha sido implicada tanto en la cascada de señalización de los TLR como en la regulación de la migración de diferentes tipos celulares del sistema inmune (Kawai *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2005). Por ello, investigamos el papel de p38 α en la modulación de la migración de las células B por la estimulación a través de TLR4. Caracterizamos primero su cinética de activación por LPS, de manera similar a como lo realizamos para ERK1/2. Las células B en condiciones basales (tiempo 0) presentaron niveles altos de p38 activa (forma fosforilada, p-p38); como resultado de la estimulación con LPS, observamos una reducción progresiva en los niveles de p-p38 (Fig. 27A). El tratamiento de las células B con un inhibidor específico de p38, BIRB785 (BIRB), a dosis (0,1 μ M) que sólo inhiben la isoforma p38 α , resultó en la ausencia de p-p38 (Fig. 27A).

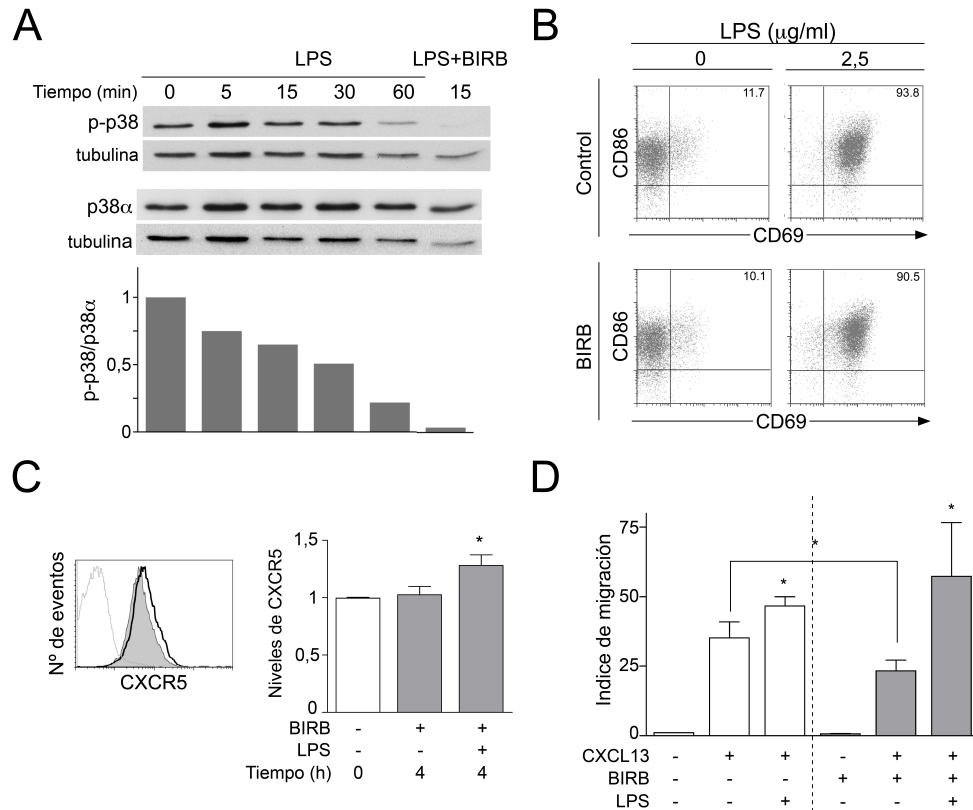


Figura 27. Participación de p38 en la señalización por TLR4 responsable de sus efectos en dinámica de células B (Parte I)

A. Niveles de proteína p-p38 y p38α en células B WT tras su estimulación con LPS (2,5 μg/ml), en ausencia o presencia del inhibidor BIRB (0,1 μM), los tiempos indicados. Panel inferior, cuantificación de los niveles de p-p38 respecto de la cantidad de p38α a cada tiempo. Se muestra un experimento representativo; tubulina, control de carga. **B-D.** Células B se pusieron en cultivo durante 4 h en ausencia o presencia de LPS y/o BIRB; a continuación, se lavaron y analizaron por citometría de flujo (**B** y **C**) o se utilizaron en ensayos de cámaras de Boyden (**D**). **B.** Niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B tras 4 h en cultivo en las condiciones indicadas. **C.** Perfil de los niveles de expresión de CXCR5 en células B tras 4 h en cultivo con BIRB, y ausencia (gris) o presencia de LPS (línea negra gruesa). Panel derecho, cuantificación de la variación en los niveles de CXCR5 por LPS y/o BIRB, relativos a células B recién aisladas (tiempo 0 h); los datos corresponden a la media ± SD (n=4). **D.** Migración de células B, tras 4 h en cultivo en las condiciones indicadas, en respuesta a gradientes de CXCL13 (400 nM); los datos corresponden a la media ± SD (n=2). Perfil de línea discontinua, control de isotipo. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

La inhibición de p38α no alteró la activación de células B por LPS a 4 h; no se detectaron cambios en los niveles de CD69 y CD86 (Fig. 27B). Tampoco impidió el incremento en los niveles de expresión de CXCR5 (Fig. 27C). En ensayos de migración en cámaras de Boyden, células B tratadas en cultivo con BIRB durante 4 h presentaron disminuida su capacidad de migración en respuesta a gradientes de CXCL13 (Fig. 27D); ello revelaba que la actividad de p38α regula la respuesta de las células B a CXCL13. En células que habían sido estimuladas con LPS durante esas 4 h de cultivo, observamos que el tratamiento con BIRB no alteró de manera significativa el aumento en migración mediado por TLR4 respecto de lo observado con células B LPS-estimuladas en ausencia de BIRB (Fig. 27D).

4.8.4. Papel de p38 α en los cambios en dinámica celular por TLR4 en el modelo 2D

Para estos estudios, utilizamos el protocolo establecido anteriormente de 1 h de estimulación con LPS, en ausencia o presencia de inhibidor (BIRB en este caso) seguido de lavado extensivo y 3 h adicionales de cultivo. En estas condiciones de estimulación, la activación celular fue similar en ausencia y presencia del inhibidor (Fig. 28A). El tratamiento con BIRB no modificó la respuesta de las células B a CXCL13, mostrando valores similares a las células no-tratadas en los distintos parámetros medidos (Fig. 28B-C). Los efectos del LPS sobre la polarización, migración y direccionalidad fueron observables y comparables entre células tratadas con BIRB y no-tratadas (Fig. 28B-C); no se observaron cambios en los valores de velocidad media. Estos resultados sugerían que p38 α no participaba en la cascada de señalización de TLR4 que modula la migración de las células B.

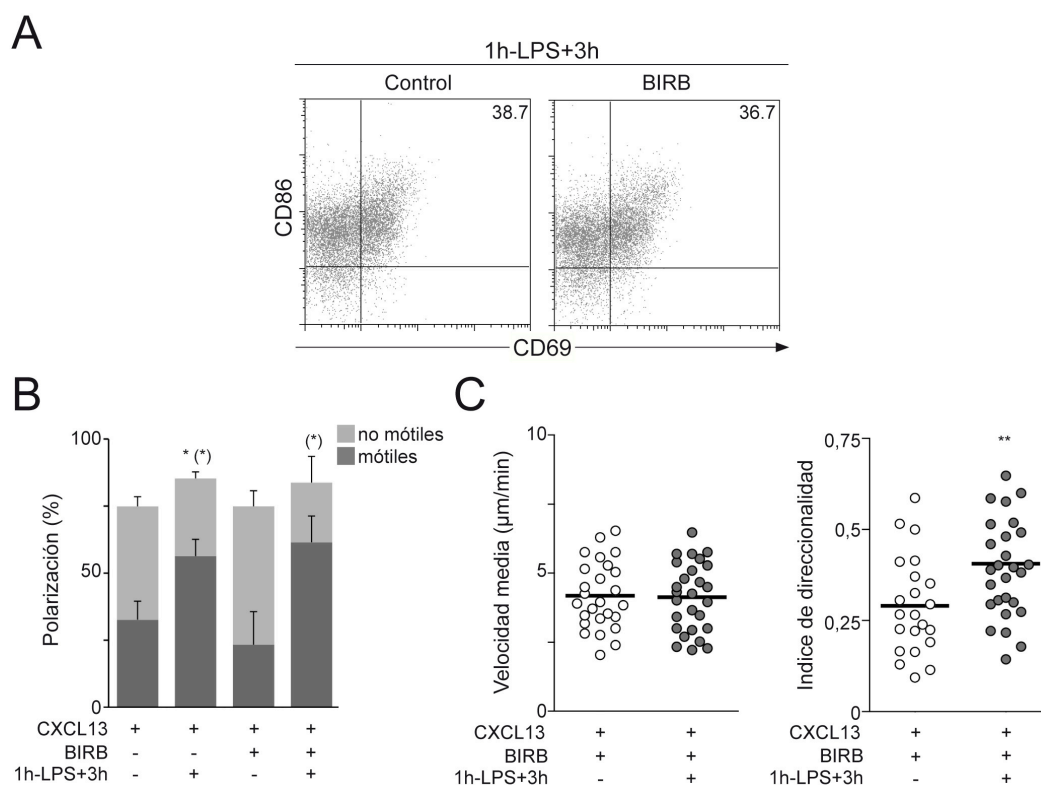


Figura 28. Participación de p38 en la señalización por TLR4 responsable de sus efectos en dinámica de células B (Parte II)

Células B se pusieron en cultivo durante 1 h en ausencia o presencia de LPS y/o el inhibidor BIRB, se lavaron y se dejaron en cultivo 3 h más en ausencia de LPS/BIRB; a continuación se recogieron y utilizaron para los ensayos pertinentes. **A**, Niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B tras su cultivo en las condiciones indicadas. **B**, Frecuencias de polarización, indicando la fracción de células en migración (móviles), de células B sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13, en cada caso. **C**, Valores de velocidad media (izquierda) e índice de direccionalidad (derecha) de células B en migración en B, tras las condiciones de cultivo indicadas. Datos mostrados en B son la media \pm SD de las réplicas de un experimento representativo; datos en C son de un experimento representativo (n=2), cada punto es una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

4.9. Implicación de p38 γ y p38 δ MAPK en la ruta de señalización de TLR4

Durante la realización de este trabajo de tesis se describió la participación de las isoformas p38 γ y p38 δ en la ruta de señalización de TLR4 que media la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos (Risco *et al.* 2012). Además, se adscribió un papel importante a p38 δ en la migración de neutrófilos a los sitios de infección (Ittner *et al.*, 2012). Nos propusimos estudiar si p38 γ/δ participaban en la ruta de señalización de TLR4 responsable de los cambios en comportamiento de las células B. Caracterizamos su expresión a nivel de proteína, puesto que no existían estudios específicos para estas isoformas en células B; p38 γ resultó ser la isoforma más abundante de p38 MAPK, seguida de p38 α y p38 δ , siendo p38 β la menos abundante (Fig. 29A). Para estudiar la implicación de p38 γ/δ en la ruta de señalización por TLR4 en células B, trabajamos con ratones deficientes para ambas isoformas en fondo genético C57BL/6 (Sabio *et al.*, 2005).

4.9.1. Caracterización del compartimento B del bazo de ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$

Lo primero que observamos en estos ratones fue que presentaban bazos con menor número de células totales que los WT (Fig. 29B). El compartimento de células B de bazos p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ no presentaba alteraciones en frecuencia, pero sí en números absolutos (Fig. 29C). Un análisis en mayor profundidad de las subpoblaciones de células B reveló que mientras la frecuencia de células B FO (CD21⁺ CD23⁺) era normal, había una reducción a la mitad en la frecuencia de células B MZ (CD21^{hi} CD23⁻) (Fig. 29D-E). Estos datos indicaban que p38 γ/δ participaba en el proceso de diferenciación y/o en el mantenimiento de células B MZ.

4.9.2. Papel de p38 γ/δ en la activación y migración de células B

La estimulación de células B p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ con LPS resultó en frecuencias similares de activación a las de células B WT a 4 h y 24 h, aunque los niveles de expresión de CD69 fueron menores en las p38-deficientes (Fig. 30A). El aumento en los niveles de CXCR5 a 4 h de estimulación por LPS fue comparable entre células B p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y WT (Fig. 30B). Analizamos la migración de células B p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ no-estimuladas y estimuladas con LPS (4 h) en respuesta a un gradiente de CCL21; la ausencia de ambas isoformas de p38 no alteró la respuesta de las células B a CCL21, ni al aumento de migración debido a la estimulación a través de TLR4 (Fig. 30C). Por tanto, p38 γ/δ no estaban implicadas en los cambios en dinámica de las células B por la estimulación de TLR4 observados en este tipo de ensayos.

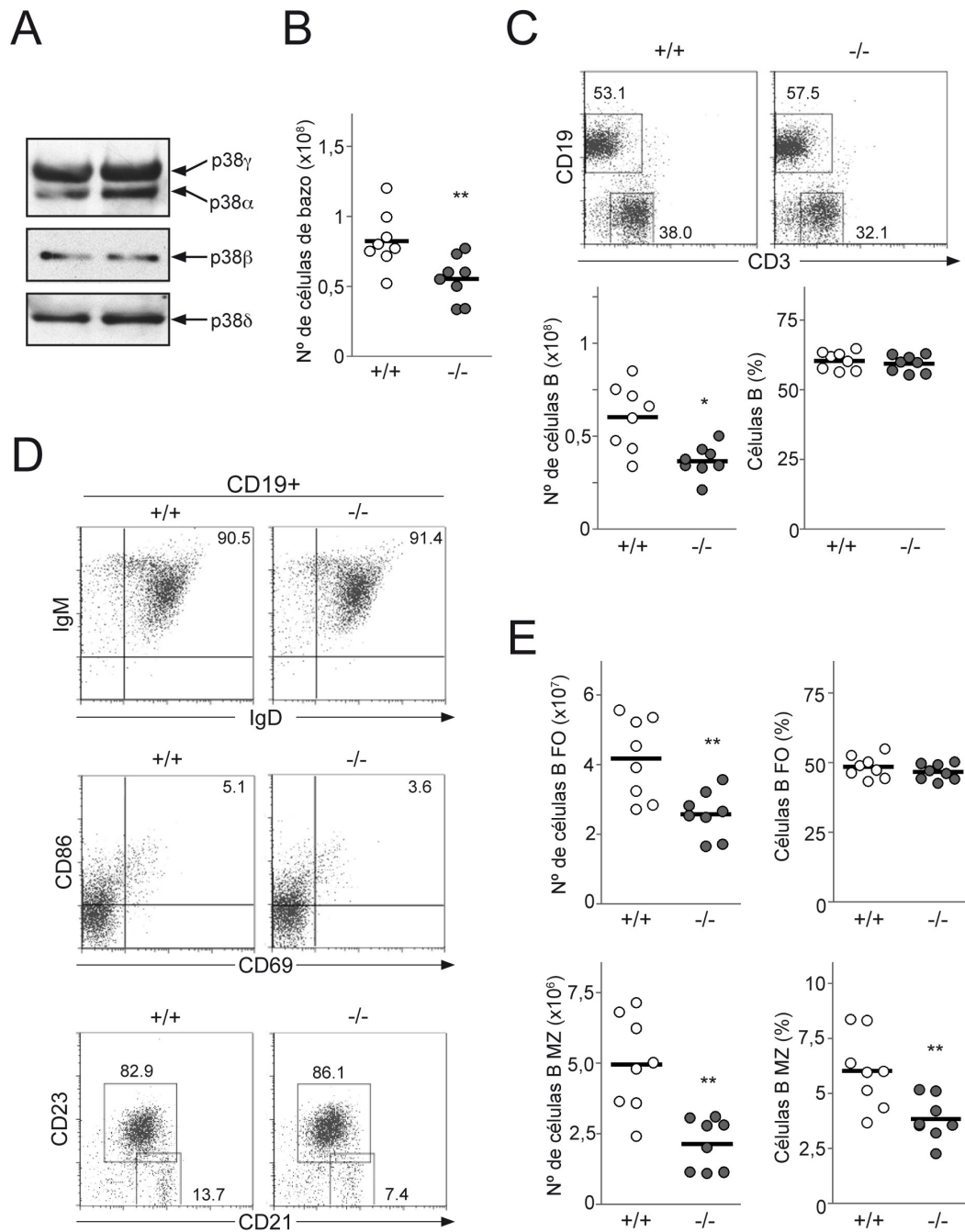


Figura 29. Caracterización del compartimento de células B de bazo en ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$

A, Niveles de expresión de proteína de las isoformas α , β , γ y δ de p38 en células B aisladas del bazo de ratones WT. **B**, Análisis del número total de células por bazo en ratones WT ($p38\gamma/\delta^{+/+}$) y $p38\gamma/\delta^{-/-}$; cada punto corresponde a un ratón. **C**, Frecuencia y número total de células B (identificadas como CD19⁺) en suspensiones celulares de bazos de ratones $p38\gamma/\delta^{+/+}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$; cada punto corresponde a un ratón. Paneles superiores, perfiles de expresión de CD19 y CD3 en células de bazo de los genotipos indicados. **D**, Caracterización del compartimento de células B de bazo de ratones $p38\gamma/\delta^{+/+}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$; análisis de los marcadores IgM, IgD, CD69, CD86, CD21 y CD23. Las regiones en los gráficos de CD21/CD23 corresponden a células B FO (CD21^{hi}CD23⁺) y células B MZ (CD21^{hi}CD23⁻). **E**, Frecuencia y número total de células B FO y células B MZ en suspensiones celulares de bazos de ratones $p38\gamma/\delta^{+/+}$ y $p38\gamma/\delta^{-/-}$; cada punto corresponde a un ratón. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

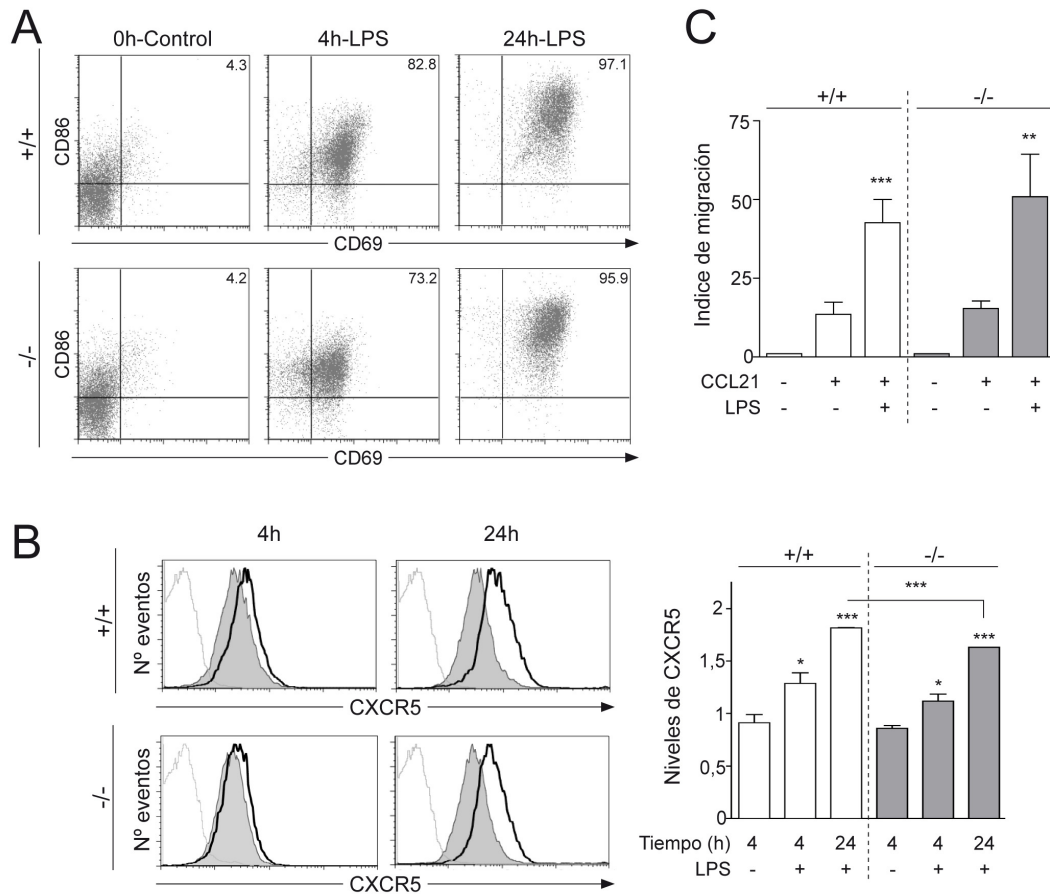


Figura 30. Papel de p38γ/δ en los efectos por TLR4 en el comportamiento de células B

Células B p38γ/δ^{+/+} y p38γ/δ^{-/-} no-estimuladas o estimuladas con LPS (2,5 μg/ml) durante los tiempos indicados (4 y 24 h), se recogieron y utilizaron para los ensayos indicados a continuación. **A**, Niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B p38γ/δ^{+/+} y p38γ/δ^{-/-} tras su cultivo en las condiciones especificadas; se muestra un experimento representativo. **B**, Perfil de los niveles de expresión de CXCR5 en células B p38γ/δ^{+/+} y p38γ/δ^{-/-} tras 4 h y 24 h en cultivo en ausencia (gris) o presencia de LPS (línea negra gruesa); línea discontinua, controles de isotipo. Panel derecho, cuantificación de la variación en los niveles de CXCR5 en cada caso, relativos a células B recién aisladas (tiempo 0 h) en cada genotipo; los datos corresponden a la media ± SD (n=2). **C**, Migración de células B p38γ/δ^{+/+} y p38γ/δ^{-/-} no-estimuladas o LPS-estimuladas durante 4 h, en respuesta a gradientes de CCL21 (100 nM); los datos corresponden a la media ± SD de las réplicas de un experimento representativo (n=2). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.10. La estimulación por TLR4 modifica la ruta de señalización de CXCR5

La exposición de células B a LPS resultaba en un aumento progresivo en los niveles de expresión de CXCR5 en la superficie de las células B, siendo ya detectable aunque leve a 4 h. Quisimos analizar si la cascada de señalización de CXCR5 en células expuestas a LPS estaba alterada y/o potenciada; en particular, estudiamos las cinéticas de activación de ERK1/2 y p38 MAPK por CXCL13 en células B que han sido pre-estimuladas o no en cultivo con LPS (4 h). Datos previos en esta tesis obtenidos con los inhibidores PD y BIRB implicaban a ambas MAPK en la migración de células B en respuesta a gradientes de CXCL13. Observamos que la estimulación con CXCL13 promueve un pico rápido y transitorio de activación de

ERK1/2 (Fig. 31A). La previa estimulación con LPS no modificó los niveles basales de p-ERK1/2, pero sí resultó en niveles más altos de p-ERK1/2 en respuesta a CXCL13 en todos los tiempos analizados, sin alterar la cinética de activación (Fig. 31A). En el caso de p38, la señalización a través de CXCR5 resultó en una disminución en los niveles de p-p38 en las células B (Fig. 31B); el tratamiento con LPS no tuvo efectos detectables sobre los niveles de p-p38. Estos datos indicaron que la exposición a LPS modulaba la activación de ERK1/2 por CXCL13, pero no la de p38. El aumento en la activación de ERK1/2 podía ser reflejo del leve aumento en los niveles de expresión de CXCR5.

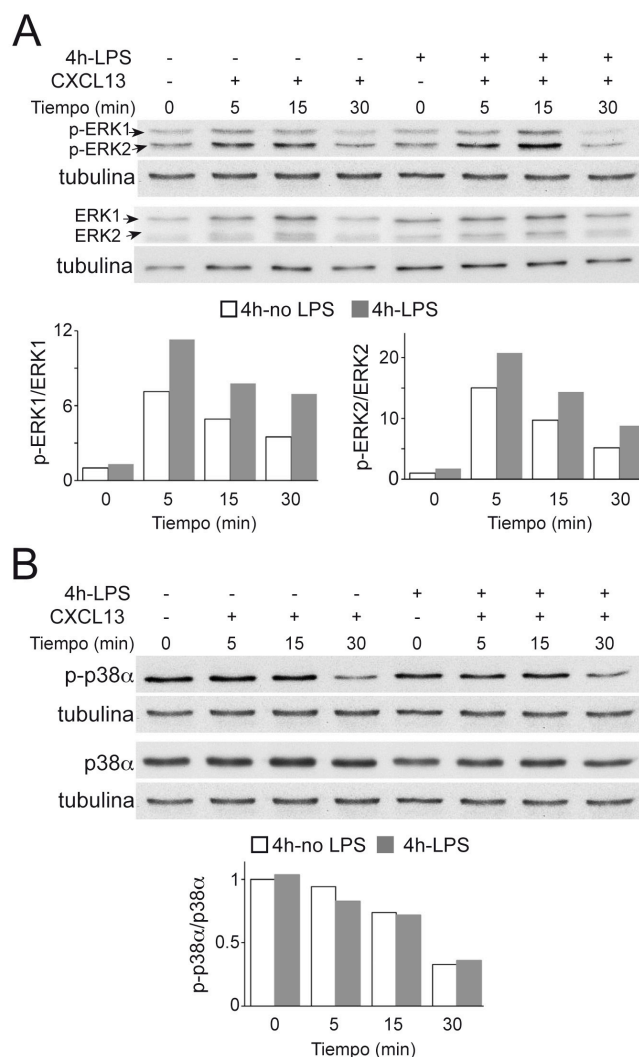


Figura 31. Efecto de la estimulación a través de TLR4 en la posterior cascada de señalización por CXCL13/CXCR5

Células B en cultivo (4 h) en ausencia o presencia de LPS, fueron posteriormente estimuladas con CXCL13 (100 nM) durante los tiempos indicados. **A**, Niveles de proteína p-ERK1/2 y ERK1/2 en células B, previamente tratadas o no con LPS, tras su estimulación con CXCL13 los tiempos indicados. Paneles inferiores, cuantificación de los niveles de p-ERK1/2 respecto de la cantidad de ERK1/2 a cada tiempo, y relativizados a los niveles a tiempo 0 en células B no-estimuladas. **B**, Niveles de proteína p-p38 y p38 α en células B, previamente tratadas o no con LPS, tras su estimulación con CXCL13 los tiempos indicados. Panel inferior, cuantificación de los niveles de p-p38 respecto de la cantidad de p38 α a cada tiempo, y relativizados a los niveles a tiempo 0 en células B no-estimuladas. Datos mostrados en A, B corresponden a experimentos representativos (n=3); tubulina, control de carga.

4.11. Papel de la familia de las Rho GTPasas en los cambios de comportamiento celular producidos por la estimulación a través de TLR4

La familia de las Rho GTPasas está compuesta por 23 proteínas clasificadas en 7 subfamilias, siendo RhoA, Rac1 y Cdc42 las más estudiadas; estas tres GTPasas son actores principales en los procesos de reorganización del citoesqueleto necesarios para la polarización, adhesión y migración celular (Heasman *and* Ridley, 2008). Por ello, y debido a que los efectos de la estimulación a través de TLR4 eran notables en los citados procesos celulares, decidimos estudiar el papel de las Rho GTPasas en la ruta de señalización de TLR4 en células B.

4.11.1. RhoA y su principal efector la miosina no muscular de tipo II (NM-II)

RhoA regula la adhesión por integrinas de los linfocitos en respuesta a quimioquinas (Laudanna *et al.*, 1996), así como la formación del urópodo, estructura celular donde se acumula RhoA y desde donde controla la activación de NM-II (del Pozo *et al.*, 1999). Observamos por western-blot que los niveles de RhoA en células B no se modificaban tras la estimulación con LPS a tiempos cortos (4 h) (Fig. 32A). Utilizamos ensayos de G-LISA para analizar los niveles de la forma activa de RhoA, que corresponde a la forma unida a GTP (ver materiales y métodos). El tratamiento con LPS no modificó de manera significativa los niveles de RhoA activo en las células B (Fig. 32B, tiempo 0), ni su activación tras la estimulación con CXCL13 (Fig. 32B).

NM-II, proteína efectora de RhoA, tiene un papel importante en la migración de células T, regulando el contacto que éstas realizan con el sustrato sobre el cual se desplazan (Jacobelli *et al.*, 2004). Nuestros datos revelaban una reducción en el área de contacto de las células B LPS-estimuladas con las membranas artificiales, y en la intensidad del mismo (Fig. 17). Por ello, analizamos por western-blot la activación de NM-II en células B LPS-estimuladas y no-estimuladas, en base a los niveles de la forma fosforilada de MLC (p-MLC). Detectamos un aumento significativo en los niveles de p-MLC tras 4 h en cultivo, mientras que en las células B estimuladas con LPS durante ese tiempo los niveles de p-MLC eran más bajos y comparables a los detectados en células B recién aisladas (tiempo 0) (Fig. 32C). El conjunto de los datos indicaba que TLR4 reducía la actividad de NM-II en células B, posiblemente por un mecanismo independiente de RhoA. Sin embargo, los resultados contrastaban con lo observado en células T, donde mayor actividad de NM-II se relacionó con menor área de contacto con el sustrato.

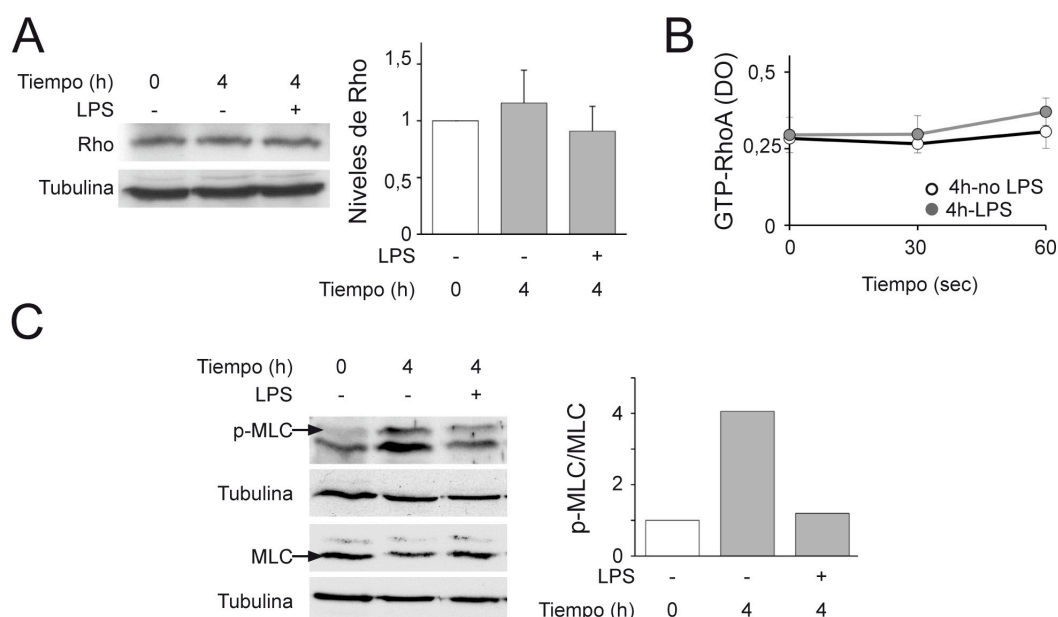


Figura 32. Implicación de la GTPasa Rho en los efectos mediados por TLR4

A, Niveles de proteína RhoA/B/C (Rho) en células B recién aisladas o tras 4 h en cultivo en ausencia o presencia de LPS. Panel derecho, cuantificación de los niveles de proteína Rho respecto a los niveles detectados a tiempo 0 h; datos mostrados son la media \pm SD ($n=3$). **B**, Niveles de forma activa de RhoA (GTP-RhoA) en lisados de células B no-estimuladas o LPS-estimuladas 4 h (tiempo 0), y tras su estimulación con CXCL13 (100 nM) los tiempos indicados; datos mostrados corresponden a la media \pm SD de las réplicas de un experimento representativo ($n=2$). **C**, Niveles de proteína de p-MLC y MLC en células B recién aisladas o tras 4 h en cultivo en ausencia o presencia de LPS. Panel derecho, cuantificación de los niveles de p-MLC respecto a los niveles de MLC en cada tiempo, y relativizados a los niveles a tiempo 0; se muestra un experimento representativo ($n=3$). Tubulina, control de carga. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.11.2. Establecimiento de un modelo de migración tridimensional confinado para el estudio de la función de NM-II en células B

El estudio citado en células T se realizó en un modelo in vitro de migración confinada en 3D (Jacobelli *et al.*, 2009), basado en el uso de microcanales (Faure-Andre *et al.*, 2008), mientras que nuestros datos provenían de un modelo 2D. Para analizar en mayor profundidad los efectos en migración de los cambios observados en la activación de NM-II en células B estimuladas con LPS, y su posible relación con las observaciones realizadas en el modelo 2D (menor área de contacto, menor fortaleza de la interacción LFA-1/ICAM-1), intentamos poner a punto el modelo 3D de los microcanales para analizar motilidad de células B en colaboración con el grupo que lo describió (Faure-Andre *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta que las células B tienen 5 μ m de diámetro, generamos microcanales de distinto tamaño (4 x 4 μ m; 6 x 5 μ m) y los tapizamos con ICAM-1 y CXCL13. Las células B se añadían próximas a la entrada de los microcanales y se incubaban durante 1 h a 37°C para permitir su entrada; a continuación se monitorizaba el comportamiento de las células dentro de los canales por microscopía de campo claro en tiempo real durante 6-10 h. Utilizamos células B aisladas de

ratones transgénicos I-Ab-GFP, en fondo C57BL/6, que lleva unido GFP a MHC-II; ello nos permitió identificar en los microcanales a las células B ($\text{IgD}^+ \text{IgM}^+$) por su alta expresión de MHC-II-GFP, frente a la fracción contaminante no-B ($\text{IgD}^- \text{IgM}^-$), cuyos niveles de GFP eran bajos o negativos (Fig. 33A). Observamos que la frecuencia de células que entraba en los microcanales era muy baja ($< 5\%$), independientemente de las condiciones de confinamiento (tamaño de los microcanales) o de las concentraciones de ICAM-1 y CXCL13 utilizadas; facilitamos su entrada aplicando vacío en el extremo opuesto (salida) de los microcanales. El análisis de las imágenes obtenidas reveló una eficiencia de migración en ambientes confinados muy reducida en células B (GFP^+), apenas se desplazan; mientras, células no-B contaminantes (GFP^-) migraban activamente, posiblemente neutrófilos (Fig. 33B). No pudimos por tanto aplicar este modelo experimental para el estudio del papel de NM-II en la motilidad de células B en espacios confinados.

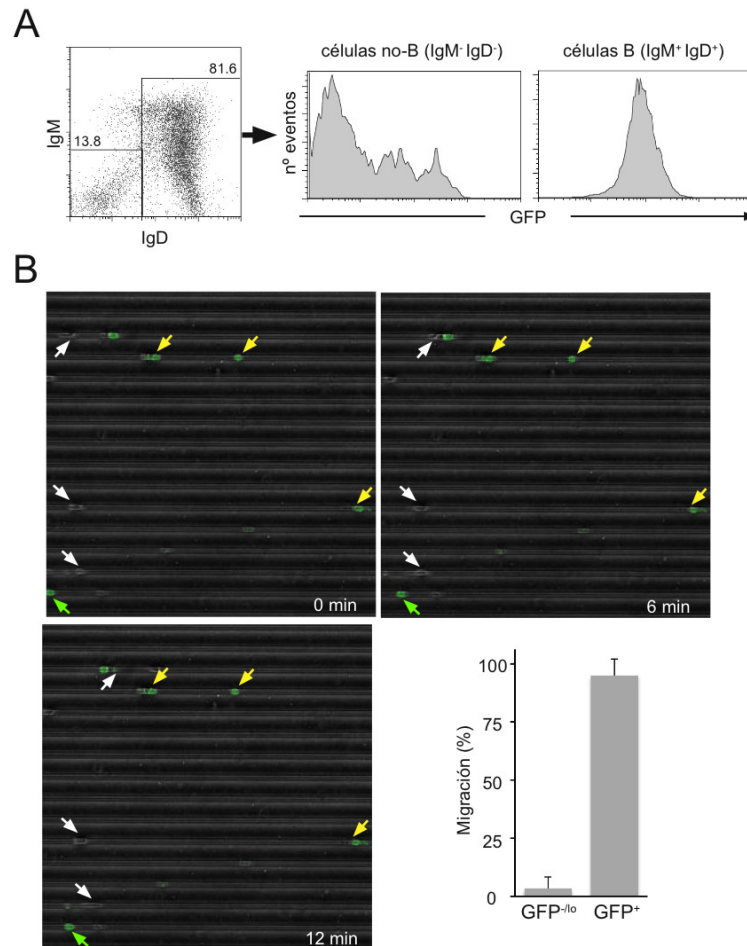


Figura 33. Puesta a punto de un modelo tridimensional confinado para estudiar el papel de NM-II en la motilidad de las células B

A, Análisis fenotípico de la población de células B aislada del bazo de ratones transgénicos para I-Ab-GFP; se muestran los marcadores IgM e IgD. A la derecha se muestra la expresión de GFP en células no-B ($\text{IgM}^-/\text{IgD}^-$) y en células B ($\text{IgM}^+/\text{IgD}^+$). **B**, Secuencia de imágenes de luz transmitida superpuesta con GFP, donde se muestra la migración de las células en el modelo 3D de microcanales; panel izquierdo, frecuencia de migración de células B (GFP^+) y células no-B ($\text{GFP}^{-/\text{lo}}$) en los microcanales. Flechas blancas, células no-B migrando; flechas amarillas, células B paradas; flecha verde, célula B que se desplaza dentro del microcanal.

4.11.3. Implicación de la ruta de Cdc42 en los efectos mediados por TLR4

Cdc42 promueve la polimerización de actina por el complejo Arp2/3 a través de su efector WASP (Castellano *et al.*, 1999). Observamos que el tratamiento de células B con LPS no modificó los niveles de proteína Cdc42, siendo similares a los de células B no-estimuladas y comparables a los observados a tiempo 0 (Fig. 34A). Usando ensayos de G-LISA, analizamos la actividad de Cdc42; no detectamos diferencias significativas en los niveles de GTP-Cdc42 (forma activa) en células B tratadas con LPS en comparación a las no-tratadas (Fig. 34B, tiempo 0), ni tampoco en su activación mediada por CXCL13 (Fig. 34B).

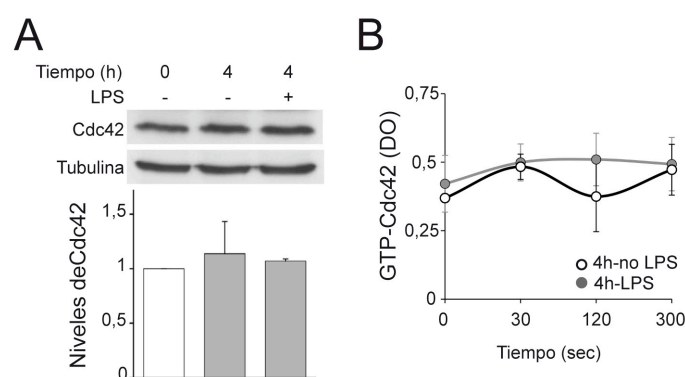


Figura 34. Implicación de la GTPasa Cdc42 en los efectos mediados por TLR4

A, Niveles de proteína Cdc42 en células B recién aisladas o tras 4 h en cultivo en ausencia o presencia de LPS. Panel inferior, cuantificación de los niveles de proteína Cdc42 respecto a los niveles detectados a tiempo 0 h; datos mostrados son la media \pm SD ($n=3$). Tubulina, control de carga. **B**, Niveles de forma activa de Cdc42 (GTP-Cdc42) en lisados de células B no-estimuladas o LPS-estimuladas 4 h (tiempo 0), y tras su estimulación con CXCL13 (100 nM) los tiempos indicados; datos mostrados corresponden a la media \pm SD de las réplicas de un experimento representativo ($n=3$). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

Células B que carecen de WASP tienen defectos en adhesión y migración en respuesta a quimioquinas (Westerberg *et al.*, 2005). En el transcurso de este estudio, WASP se implicó en regular la direccionalidad en la migración de macrófagos (Ishihara *et al.*, 2012). Por todo ello, quisimos analizar el papel de WASP en los efectos en dinámica de células B por TLR4. Usamos células B de ratones deficientes para WIP (*WASP interacting protein*), en fondo genético 129/SvJ; la deficiencia en WIP resulta en una reducción $> 90\%$ en los niveles de WASP (de la Fuente *et al.*, 2007), y las células B tienen defectos en la polimerización de actina y la formación de protusiones de membrana (Anton *et al.*, 2002). Células B WIP^{-/-} se activaron con LPS y aumentaron los niveles de CXCR5 en superficie de manera similar a las WT (Fig. 35A-B); los niveles de CD69 y CD86 fueron más altos respecto de lo observado con células B de fondo genético C57BL/6 a ese tiempo (4 h). En cámaras de Boyden, la migración de las células B WIP^{-/-} en respuesta a gradientes de CXCL13 fue menor que para las WT, y los efectos de la estimulación por LPS no se observaron (Fig. 35C).

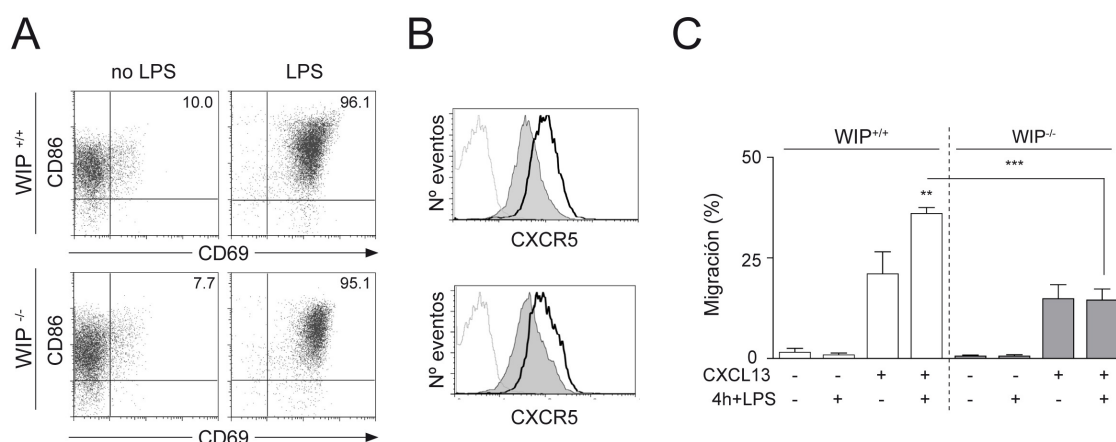


Figura 35. Efectos de la estimulación por TLR4 en células B deficientes para WIP

Células B WT (WIP^{+/+}) y WIP^{-/-} se pusieron en cultivo durante 4 h en ausencia o presencia de LPS; a continuación, se recogieron y utilizaron para los ensayos siguientes. **A**, Niveles de expresión de CD69 y CD86 en células B WIP^{+/+} y WIP^{-/-} tratadas o no con LPS. **B**, Perfil de los niveles de expresión de CXCR5 en células B WIP^{+/+} y WIP^{-/-} no-estimuladas (gris) o LPS-estimuladas (línea negra gruesa); línea discontinua, controles de isotipo. **C**, Frecuencia de migración de células B WIP^{+/+} y WIP^{-/-} no-estimuladas o LPS-estimuladas, en respuesta a gradientes de CXCL13 (400 nM); datos mostrados corresponden a la media \pm SD (n=2). Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

A continuación realizamos ensayos en el modelo 2D en ausencia y presencia de CXCL13. Las células B WIP^{-/-} no-estimuladas presentaron frecuencias de adhesión, polarización y migración, así como valores de velocidad e índice de direccionalidad inferiores a los obtenidos con células B WT en respuesta a CXCL13 (Fig. 36); estos resultados habían sido observados previamente en el laboratorio (Bañón-Rodríguez *et al.*, 2013). La estimulación con LPS (4 h) resultó en los cambios previamente descritos tanto en células B WT como en las WIP^{-/-} (Fig. 36); además, las diferencias encontradas en distintos parámetros entre células B WT y WIP^{-/-} en respuesta a CXCL13 desaparecieron tras la estimulación con LPS (Fig. 36). Los datos indicaron por tanto que mientras WIP/WASP estaban implicados en la mediación de los efectos de TLR4 en entornos de migración 3D, independientes de adhesión, no eran necesarios para mediar los efectos de TLR4 en la motilidad de células B en entornos dependientes de adhesión. Aunque no detectamos alteraciones en Cdc42 por la estimulación de LPS en los tiempos analizados, posiblemente también participe.

4.11.4. Papel de Rac en la modulación de la migración por TLR4

Rac regula la formación del frente de avance o lamelipodio en células en migración, y la polimerización de actina en el mismo mediante la activación de Arp2/3 (Heasman *and* Ridley 2008). La estimulación con LPS no modificó los niveles de proteína Rac en las células B (Fig. 37A). Sin embargo, sí observamos diferencias interesantes en los niveles de Rac activo (GTP-Rac) medidos mediante ensayos de G-LISA. El tratamiento con LPS (4 h) aumentó significativamente los niveles de actividad de Rac (Fig. 37B, tiempo 0); además, tras la estimulación con CXCL13, la activación

de Rac fue mayor y más sostenida en el tiempo en células B LPS-estimuladas en comparación a no-estimuladas (Fig. 37B).

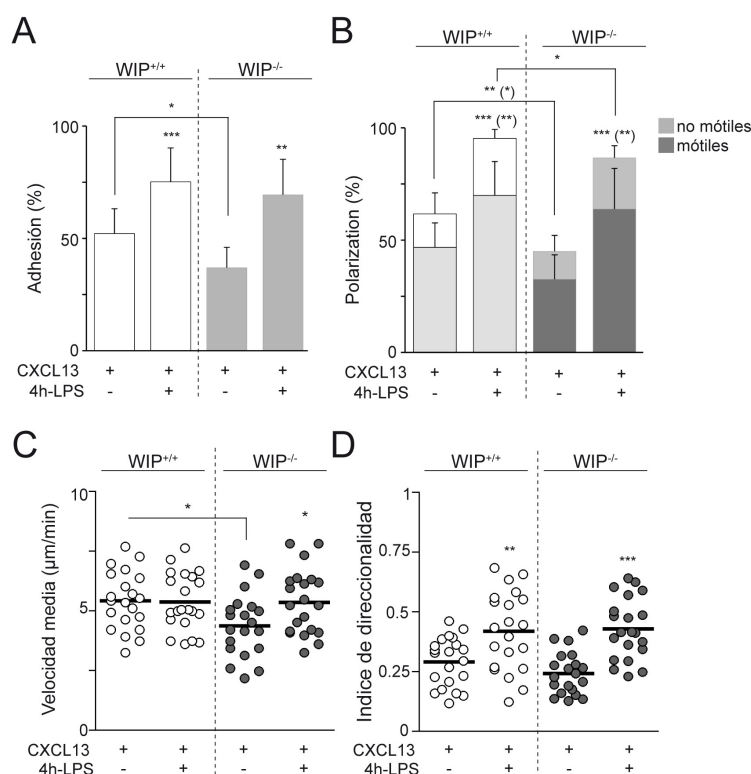


Figura 36. Implicación de WASP/WIP en los efectos de TLR4 sobre la dinámica de células B en el modelo 2D

Células B WIP^{+/+} y WIP^{-/-} marcadas con sondas fluorescentes (CFSE, SNARF-1), se pusieron en cultivo separadamente en ausencia o presencia de LPS durante 4 h; a continuación, se lavaron, se mezclaron en ratio 1:1 aquellas con iguales condiciones de estimulación, y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 y CXCL13. **A**, Frecuencias de adhesión y **B**, frecuencias de polarización, indicando la fracción de células en migración (móviles), de células B WIP^{+/+} y WIP^{-/-} tratadas o no con LPS previamente, como se indica. **C**, Valores de velocidad media e **D**, índice de direccionalidad de las células B migrando en B. Los datos mostrados en A, B son la media \pm SD (n=2); los datos en C, D corresponden a un experimento representativo (n=3), cada punto es una célula. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*; estadística entre paréntesis corresponde al análisis de los datos de células móviles.

Estudiamos distintos efectores de Rac. La proteína WAVE-2, perteneciente a la familia de WASP e implicado en la activación de Arp2/3 a través de Rac, no presentaba alteraciones en sus niveles de expresión en células B tras la estimulación con LPS (Fig. 37C). Analizamos su localización en células B migrando sobre las membranas en presencia de CXCL13 por inmunofluorescencia; WAVE-2 se acumulaba en las zonas ricas en F-actina, correspondiente a los frentes de avance o lamelipodios de la célula B, sin presentar diferencias significativas entre células B no-estimuladas y LPS-estimuladas (Fig. 37D). Las proteínas PAK1 y PAK2 (*p21-activated kinase*), efectores de Rac, regulan la polimerización de actina e intervienen en la activación de MLC en el lamelipodio (Sanders *et al.*, 1999). Analizamos los niveles de las formas

activas de PAK1 y PAK2 (formas fosforiladas, p-PAK) en células B no-estimuladas y LPS-estimuladas por western-blot. Datos preliminares mostraron que la señalización a través de TLR4 aumentó significativamente los niveles de p-PAK1 pero no de p-PAK2 (Fig. 37E). Aunque estudios en mayor profundidad son necesarios, los datos sugerían que TLR4 utilizaba el eje Rac/PAK1 para mediar sus efectos sobre la dinámica de las células B.

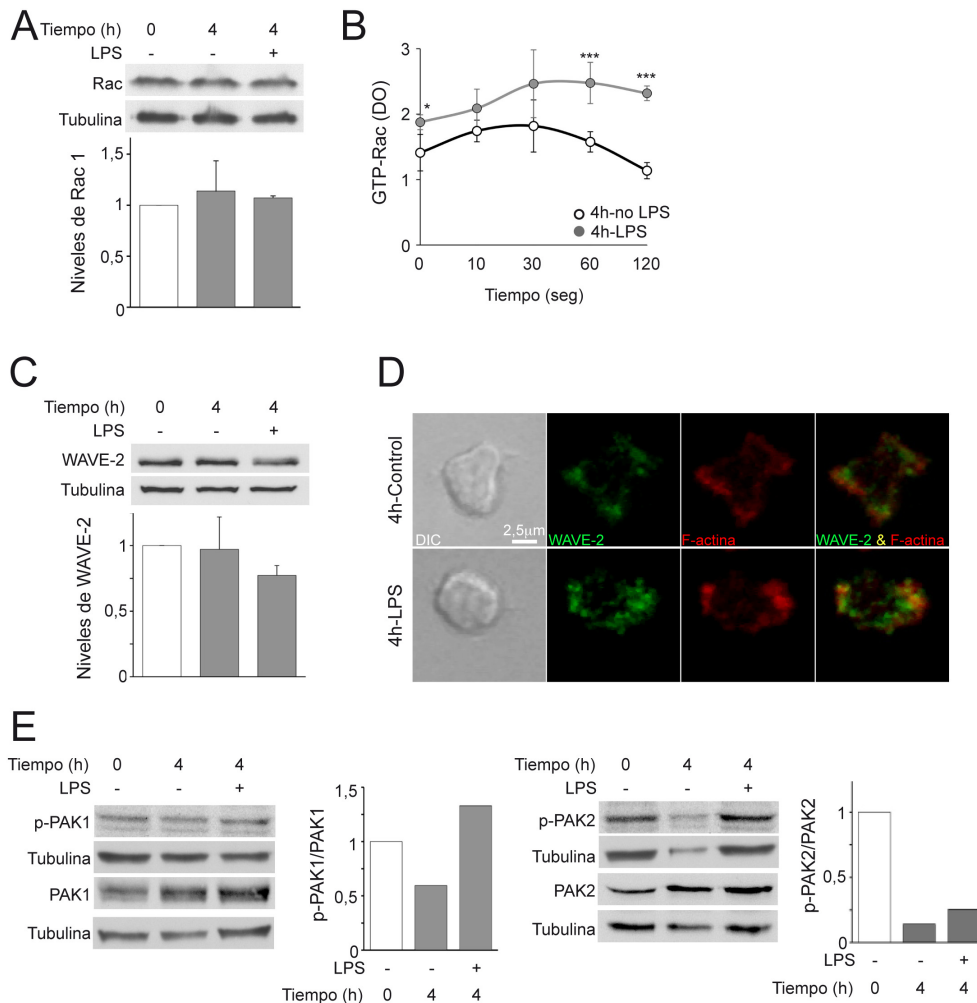


Figura 37. Implicación de la GTPasa Rac en los efectos mediados por TLR4

A, Niveles de proteína Rac1/2/3 (Rac) en células B recién aisladas o tras 4 h en cultivo en ausencia o presencia de LPS. Panel inferior, cuantificación de los niveles de proteína Rac respecto a los niveles detectados a tiempo 0 h; datos mostrados son la media \pm SD ($n=3$). **B**, Niveles de forma activa de Rac (GTP-Rac) en lisados de células B no-estimuladas o LPS-estimuladas 4 h (tiempo 0), y tras su estimulación con CXCL13 (100 nM) los tiempos indicados; datos mostrados corresponden a la media \pm SD ($n=3$). **C**, Niveles de proteína WAVE-2 en células B y cuantificación, como en A; datos mostrados son la media \pm SD ($n=3$). **D**, Imágenes de DIC y fluorescencia para WAVE-2 y faloidina (F-actina) de células B representativas no-estimuladas o LPS-estimuladas migrando sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13; las imágenes corresponden al plano confocal de contacto entre la célula B y la membrana. **E**, Niveles de proteína p-PAK1 y PAK1 (izquierda) y de p-PAK2 y PAK2 (derecha) en células B recién aisladas o tras 4 h en cultivo en ausencia o presencia de LPS. Paneles inferiores, cuantificación de los niveles de p-PAK1/2 respecto a los niveles de PAK1/2 en cada tiempo, y relativo a los niveles detectados a tiempo 0 h; datos correspondientes a un experimento representativo ($n=2$). Tubulina, control de carga. Análisis estadístico aplicado, *Student t-test*.

4.12. Modificaciones en el citoesqueleto cortical de actina mediadas por TLR4

Uno de los efectos más consistentes producidos por la estimulación con LPS ocurría a nivel de la polarización de la célula B en respuesta a quimioquina. La emisión de protusiones de membrana era mucho más activa, lo cual sugería procesos rápidos y muy dinámicos de reorganización del citoesqueleto de actina. Mediante tinción intracelular con Faloidina fluorescente, medimos los niveles de actina polimerizada (F-actina) en las células B por citometría de flujo. El tratamiento con LPS (4 h) aumentó de forma significativa los niveles de F-actina en las células B (Fig. 38A). La presencia de un inhibidor específico de Rac durante el tiempo de estimulación con LPS impidió el aumento en el contenido de F-actina (Fig. 38A), lo cual indicaba que Rac era responsable del aumento en F-actina y posiblemente del aumento en polarización celular mediado por LPS.

Otra familia de proteínas implicadas en la regulación de los cambios de morfología necesarios para la migración de las células es la familia de proteínas ERM. Éstas sirven de enlace entre el citoesqueleto cortical de actina y la membrana plasmática; están implicadas en el reclutamiento de Rho GTPasas a la membrana y son, a su vez, reguladas por ellas. Observamos que los niveles de la forma activa de Moesina (forma fosforilada, p-Moesina), ERM mayoritaria en células B, eran significativamente mayores en células B LPS-estimuladas (Fig. 38B). Analizamos la localización de p-Moesina en células B migrando en el modelo 2D en presencia de CXCL13, por inmunofluorescencia; la encontramos principalmente localizada en zonas ricas en F-actina, sin diferencias apreciables entre células B no-estimuladas y LPS-estimuladas (Fig. 38C). Por tanto, Moesina resultaba ser otro de los efectores moleculares que utiliza TLR4 para modular la dinámica de las células B; su posible relación con la mayor actividad de Rac requerirá de más estudios.

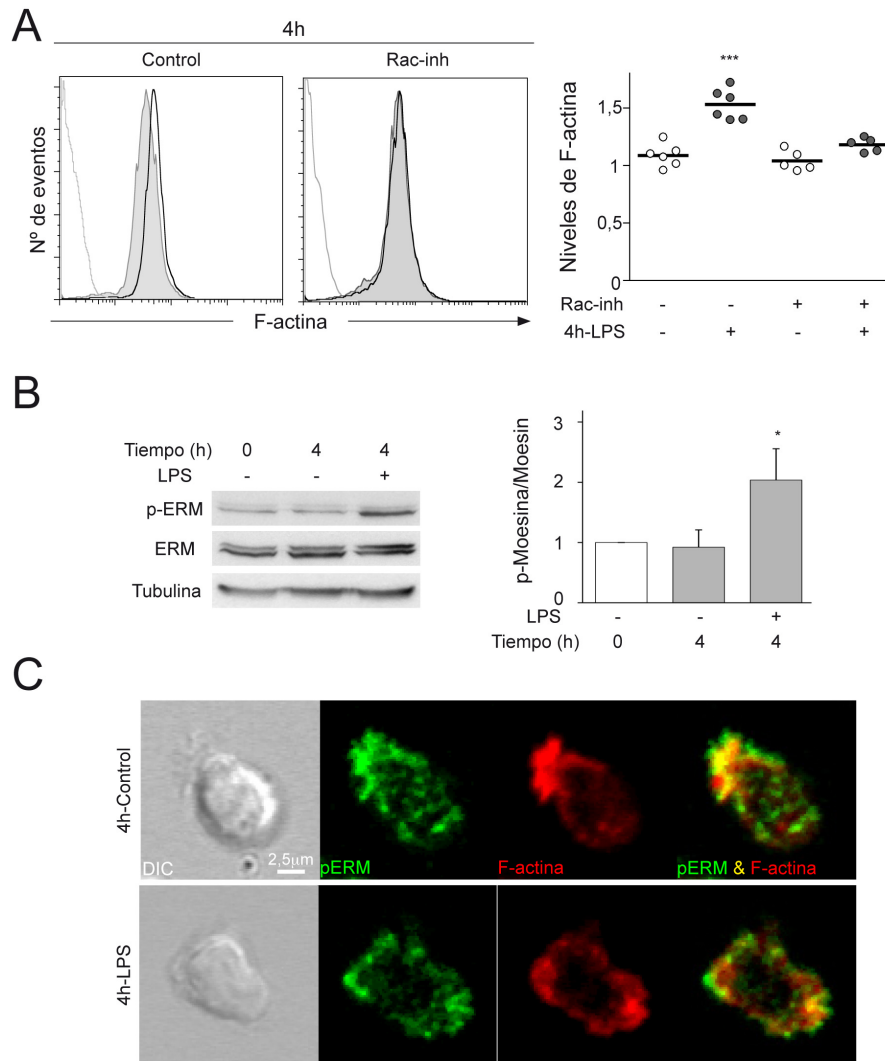


Figura 38. Efectos de la estimulación a través de TLR4 sobre el citoesqueleto de actina y proteínas ERM en células B

A, Perfil de los niveles de expresión de F-actina en células B no-estimuladas (gris) y LPS-estimuladas (línea negra gruesa) durante 4 h, en ausencia (izquierda) o en presencia del inhibidor de Rac (derecha). Panel derecho, cuantificación de los niveles de F-actina, expresados como el ratio de la media geométrica de fluorescencia en cada condición respecto de la señal de fluorescencia en células B recién aisladas. Perfil de línea discontinua, controles negativos (células sin teñir). **B**, Niveles de proteína p-ERM y ERM en células B recién aisladas o tras 4 h en cultivo en ausencia o presencia de LPS. Panel a la derecha, cuantificación de los niveles de p-Moesina respecto de Moesina total, relativizados a los niveles detectados a tiempo 0 h; datos mostrados son la media \pm SD (n=3). Tubulina, control de carga. **C**, Imágenes de DIC y fluorescencia para p-ERM y faloidina (F-actina) de células B representativas no-estimuladas o LPS-estimuladas migrando sobre membranas con ICAM-1 y CXCL13; las imágenes corresponden al plano confocal de contacto entre la célula B y la membrana. Análisis estadístico aplicado, Student t-test.

5. DISCUSIÓN



5.1. Efectos de la estimulación a través de TLR4 en el comportamiento de las células B

Las células B expresan varios miembros de la familia de los TLR; los efectos de la señalización a través de estos receptores en el comportamiento de las células B apenas han sido estudiados. Nuestro estudio muestra que la estimulación con LPS, ligando de TLR4, de las células B resulta en alteraciones complejas en su comportamiento y motilidad. La presencia de LPS modula de manera distinta la migración de las células B en respuesta a diferentes quimioquinas; bajas dosis de LPS disminuyen la migración a gradientes de CXCL12, sin afectar la respuesta a CXCL13 a tiempos tempranos. Además, los niveles de CXCR4 disminuyen mientras los de CXCR5 aumentan con el tiempo de estimulación por LPS, lo cual sugiere que la activación de TLR4 va a aumentar la migración a CXCL13 y disminuir la respuesta a CXCL12. Debido al papel de CXCL12 y L-selectina en el *homing* de células B a los OLS (Okada *et al.*, 2002), y teniendo en cuenta la bajada transitoria de CD62L observada, es posible que LPS disminuya la entrada de las células B a los órganos linfoides. Sin embargo, datos publicados durante el desarrollo de esta tesis doctoral indican que la estimulación por TLR4 durante 18 h aumenta la quimiotaxis de las células B en respuesta a CXCL12 (Hwang *et al.*, 2009); a esos tiempos nosotros observamos la recuperación de los niveles de CD62L, pero los niveles de CXCR4 son del 50%. Estudios en mayor profundidad serán necesarios para esclarecer los efectos del tiempo de estimulación y dosis de LPS en el *homing* de las células B mediado por CXCL12. Sin embargo, sí observamos un aumento de quimiotaxis en respuesta a CXCL13 y CCL21 tras 4 h de estimulación con LPS, de acuerdo con estudios publicados (Hwang *et al.*, 2009); ello indica que células B que encuentran y son estimuladas por ligandos de TLR4 adquieren una mayor capacidad de respuesta a estas quimioquinas.

Dosis elevadas de LPS bloquean completamente la migración de las células B, independientemente de la presencia de CXCL12 o de CXCL13. La presencia de inflamación o infección sistémica puede causar un shock séptico o sepsis, y la señalización a través de TLR4 parece jugar un doble papel en estas situaciones. La deficiencia en la cascada de señalización dependiente de MyD88 protege frente al shock séptico (Weighardt *et al.*, 2002; Roger *et al.*, 2009). También se ha descrito que deficiencias en la señalización por TLR4 provocan un aparente defecto en la respuesta inflamatoria en los primeros días, mientras a día 14 post-infección la respuesta inflamatoria es exacerbada, produciéndose un aumento de la mortalidad (Naiki *et al.*, 2005). Es posible que la inhibición de la migración/motilidad en células B por altas dosis de LPS favorezca la sepsis, al impedir su normal funcionamiento y por tanto la resolución de la infección; sin embargo, la activación de las células B a tiempos prolongados de exposición (24 h en nuestros estudios) podría contribuir a

la lucha contra la infección sistémica. Por todo ello una deficiencia en la señalización a través de TLR4 protegería contra la sepsis inicialmente pero a posteriori sería adverso.

Los datos del modelo 2D revelan que la mayor capacidad de migración de las células B LPS-estimuladas es consecuencia de un aumento en la adhesión mediada por LFA-1, polarización y migración celular, además de presentar una mayor direccionalidad en su movimiento en respuesta a CXCL13. Nuestros datos concuerdan con observaciones *in vivo*, que muestran un aumento en la polarización y direccionalidad de células B estimuladas con LPS (18 h) que se localizan en los folículos (Hwang *et al.*, 2009). En respuesta a CCL21, observamos un aumento en la capacidad de migración pero no en la direccionalidad. Se ha publicado recientemente que las células B estimuladas con LPS son capaces de atravesar más rápidamente el área T (donde predomina CCL21), para llegar al folículo donde se concentra CXCL13 (Park *et al.* 2012). En base a estos datos, proponemos que la estimulación por TLR4 en células B optimiza su localización y migración a los folículos. El aumento de direccionalidad en respuesta a CXCL13 puede facilitar el *scanning* de un área mayor en el folículo y, así, maximizar las probabilidades de encontrar y reconocer posibles antígenos a través del BCR; además, puede constituir un mecanismo de control para evitar la migración de células B activadas por el LPS y expresando altos niveles de MHC-II y CD40 al paracortex, minimizando así la posibilidad de recibir co-estimulación por células T en ausencia de antígeno.

Los resultados obtenidos con células B deficientes para MyD88 o TRIF, indican que los efectos del LPS en la migración de las células B dependen de la señalización a través de MyD88, con un papel menor de la ruta de TRIF. Parece por tanto que la ruta dependiente de TRIF apenas participa de los cambios en comportamiento por TLR4 en las células B. De manera similar, en macrófagos, la fagocitosis se ve aumentada por la señalización a través de TLR (Kong *and* Ge, 2008; Chen *et al.* 2010); la deficiencia en MyD88 resulta en un menor aumento de la fagocitosis pero aún detectable, probablemente debido a la activación de la ruta de TRIF (Kong *and* Ge, 2008).

5.2. Mecanismos moleculares implicados en los cambios en la migración de las células B

La mayor parte de los estudios sobre los efectos de TLR en células B se han centrado en las etapas finales de la respuesta inmune humoral, en la producción de anticuerpos (Pasare *and* Medzhitov, 2005; Nemazee *et al.*, 2006; Minguet *et al.*, 2008). Poco se sabe acerca de cómo estas señales afectan al comportamiento de las células B y los mecanismos moleculares implicados, ambos objetivos de esta tesis.

La actividad de las MAPK ERK1/2 y p38 es modulada tanto por LPS/TLR4 como por CXCL13/CXCR5. El balance entre la actividad de ERK1/2 y p38 está implicado en la activación de la proteína GRK2, que regula la migración de los neutrófilos (Liu *et al.*, 2012a), y con el desensamblaje de podosomas y la formación de *ruffles* de membrana en células dendríticas estimuladas con LPS (West *et al.*, 2004). Mediante el uso de inhibidores químicos, concluimos que ERK1/2 y p38 no participan de la cascada de TLR4 implicada en los efectos sobre la dinámica de las células B. Sin embargo, observamos que la previa estimulación a través de TLR4 aumenta los niveles de activación de ERK1/2 por CXCL13/CXCR5; este efecto modifica por tanto el balance que la señalización a través de CXCR5 establece entre ERK1/2 y p38 que podría contribuir a la mayor migración y direccionalidad de las células B LPS-estimuladas. Otras proteínas importantes en la migración de las células B son Syk (Pearce *et al.*, 2011; Spaargaren *et al.*, 2003) y PI3K (Reif *et al.*, 2004). La activación de ambas ha sido recientemente relacionada con la señalización a través de TLR y dependiente de MyD88 (Troutman *et al.*, 2012; Jabara *et al.*, 2012), por lo que podrían estar implicadas en modular la migración de las células B por LPS.

Los experimentos con células B deficientes en WIP/WASP mostraron defectos severos en polarización y adhesión de las células B en el modelo 2D, como se ha publicado recientemente (Bañón-Rodríguez *et al.*, 2013). Sin embargo, su estimulación con LPS (4 h) resultaba en la recuperación de las frecuencias de polarización, adhesión y los valores de direccionalidad de células B WT en el modelo 2D, pero no en los ensayos de migración en 3D (cámaras de Boyden). La deficiencia de Cdc42, activador de WASP, en células dendríticas afecta a su migración tanto en modelos 2D como en 3D, siendo los efectos de la deficiencia de Cdc42 más dramáticos en los ensayos en 3D (Lammermann *et al.*, 2008). Aunque en células B no detectamos variaciones en los niveles de proteína total o de actividad de Cdc42 tras la estimulación por TLR4, los datos parecen indicar que la cascada de Cdc42/WASP no participaría en los efectos sobre la motilidad de células B dependiente de adhesión (modelo 2D), pero sí en entornos 3D y en respuesta a gradientes quimiotácticos.

La estimulación con LPS no afecta la actividad de Rho, pero sí disminuye la de su efector NM-II en células B. La menor actividad de NM-II, sin embargo, no se traduce en un aumento en el área de contacto de la célula B con la membrana artificial, consistente con la migración de tipo *sliding* que se ha observado en células T (Jacobelli *et al.*, 2009). En este trabajo los autores proponen que el balance entre la actividad de NM-II para mantener la tensión cortical y la fuerza de la adhesión con el sustrato es clave para que la célula migre de modo *sliding* o *walking*. En nuestros experimentos, la menor actividad de NM-II se relaciona con una reducción en el área e intensidad de contacto con el sustrato, de modo que las células B desarrollan

un movimiento de tipo *walking*; este modo de migración es más eficiente que el *sliding* por lo que mantenerlo favorecería el encuentro de la célula B con posibles antígenos en el folículo. La reducción en los niveles de NM-II independientemente de la actividad de Rho, indica que su actividad en células B puede ser regulada por otras quinasas además de ROCK. En otros tipos celulares, se ha implicado a PAK en la regulación de NM-II (Sanders *et al.*, 1999). PAK puede ser activada tanto por Cdc42 como por Rac, por lo que éste podría ser uno de los mecanismos que coordinan por un lado la formación de extensiones de membrana en el lamelipodio por Rac, y por otro lado la contracción del citoesqueleto de actina por NM-II, de manera similar al mecanismo propuesto en neutrófilos (Pestonjamasp *et al.*, 2006).

Junto con la proteína motora NM-II, Rac se ha implicado en el control de la direccionalidad en otros tipos celulares (Wu *et al.*, 2009). Nuestros datos indican que la actividad de Rac aumenta en células estimuladas con LPS, tanto en niveles de Rac activo como en la cinética de activación en respuesta a estímulos quimiotácticos. Ello además está en consonancia con el aumento en la polimerización de actina que hallamos, aunque no detectamos cambios relevantes en el principal efector de Rac, WAVE2. La estimulación con LPS en células B causa un aumento en la actividad de PAK1 y en menor medida de PAK2, consistentes con el aumento de la actividad de Rac. Como efector de Rac, PAK se ha relacionado con un aumento en la proyección del lamelipodio, así como en la direccionalidad en ensayos de migración con líneas celulares (Delorme-Walker *et al.*, 2011). En macrófagos, se ha observado que la deficiencia de PAK produce una menor persistencia de los lamelipodios (Smith *et al.*, 2008). Por tanto, la activación de PAK por LPS promovería el aumento en polarización celular y direccionalidad observados en células B, pudiendo ser una ruta alternativa a la de WAVE2 para la polimerización de actina via Rac. Además, puesto que PAK es un regulador negativo de NM-II, ello explicaría la reducción en los niveles de NM-II activo en ausencia de cambios en la actividad de Rho.

La señalización a través de TLR4 aumenta los niveles de la forma activa de Moesina (principal isoforma de ERM expresada en células B); sin embargo, y al contrario de lo esperado, las células B muestran una mayor motilidad en presencia de quimioquinas. Nuestros datos parecen contradictorios con los resultados de otros autores, donde la de-fosforilación de las ERM (inactivación) inducida por quimioquinas facilita la reorganización del citoesqueleto cortical de actina y aumenta la capacidad de deformación celular (Hao *et al.*, 2009; Parameswaran *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). La función de las ERM en motilidad es bastante controvertida; mientras que la expresión de la forma constitutivamente activa de Ezrina inhibe migración (Parameswaran *et al.*, 2011), en otros casos aumenta la quimiotaxis (Lee *et al.*, 2004). Otros estudios concluyen que la reducción en los niveles de ERM activas favorece la polarización celular (Belkina *et al.*, 2009); en células B, la expresión de la forma dominante negativa de Ezrina impide la reorganización del

citoesqueleto de actina necesaria para el *spreading* y la formación de la Sinapsis Inmunológica (Treanor *et al.*, 2011). Estos diferentes resultados pueden deberse al empleo de construcciones dominantes negativas y constitutivamente activas de las ERM, las cuales carecen de la capacidad de regular su activación y por ello afectar gravemente a la reorganización del citoesqueleto de actina. Datos obtenidos en células T deficientes para Rac1/2 sugieren que existe una relación entre la actividad de estas GTPasas, la polimerización de actina y la actividad de las ERM (Faroudi *et al.*, 2010). Nuestros resultados también indican que el aumento de Rac por LPS promueve aumentos en la polimerización de actina y en la activación de Moesina. Es posible que los altos niveles de Moesina activa sean necesarios para restringir la formación de nuevos lamelipodios, disminuyendo los cambios de dirección durante la migración de las células B, y por tanto un aumento en la direccionalidad del movimiento.

En base a todos estos datos, proponemos un modelo por el cual la detección de patógenos a través de TLR4 en células B desencadena una cascada de señalización dependiente de MyD88, que podría involucrar a PI3K y Syk. Ello aumenta la actividad de Rac y promueve la reorganización del citoesqueleto de actina, probablemente a través de la modulación de las actividades de PAK, moesina y NM-II. Estos cambios moleculares predisponen (*priming*) a la célula B para responder a CXCL13 con una mayor eficiencia y aumentando la direccionalidad del movimiento. El aumento en los niveles de CXCR5 y de la activación de ERK por CXCL13, junto con la mayor y persistente activación de Rac a través de CXCR5, contribuyen a modular la motilidad de las células B previamente estimuladas por TLR4 (Fig. 39). Planteamos que la presencia de ligandos de TLR en el folículo actúan como señales de alerta para las células B y optimizan la detección de posibles antígenos. Mediante el mecanismo descrito, las células B LPS-*primed* migran sobre la red de FDC que expresan ICAM-1 y CXCL13 con una capacidad aumentada de migración y mayor direccionalidad. En conclusión, la estimulación por patógenos de TLR4 en células B favorece la motilidad celular y el desarrollo de las fases iniciales de la respuesta inmune humoral.

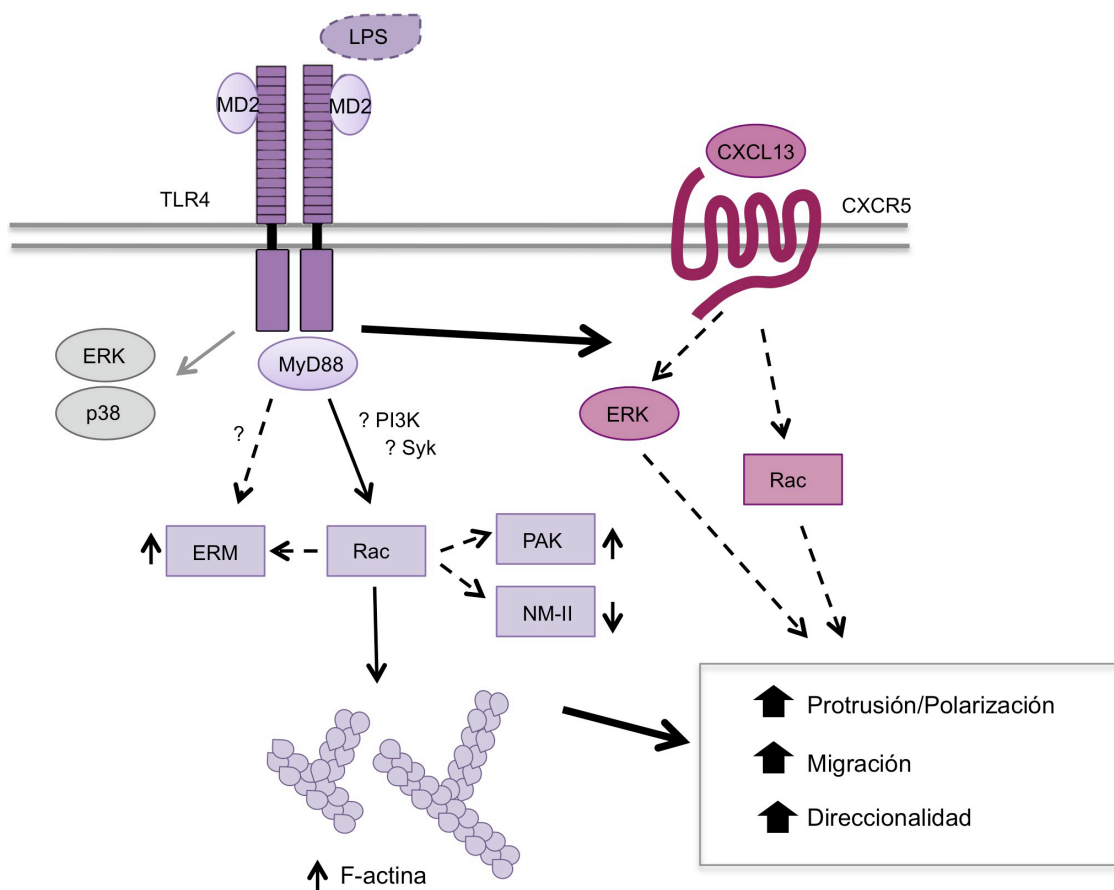


Figura 39. Esquema de la cascada de señalización implicada en los efectos de TLR4 sobre la migración de las células B. Flechas de línea discontinua indican los efectos del LPS descritos en la tesis. Flechas de línea discontinua indican las posibles relaciones en la cascada de señalización, aún bajo estudio. Flecha gris señala efectos del LPS no implicados en la ruta estudiada.

6. CONCLUSIONES



1. La estimulación a través de TLR4 regula los niveles de expresión de CXCR4, CXCR5 y CCR7 en la superficie de las células B de manera dependiente de la dosis de ligando LPS; mientras que los niveles de CXCR4 disminuyen, la expresión de CXCR5 y CCR7 aumenta.

2. La presencia de altas dosis de LPS (25 µg/ml) inhibe la migración de células B en respuesta a gradientes de CXCL12 y CXCL13, así como disminuye la polarización celular y la migración dependiente de adhesión en sustratos bidimensionales en respuesta a CXCL13. La presencia de dosis diez y cien veces inferiores de LPS no tiene efectos en dinámica celular.

3. Tiempos cortos de exposición (4 h) a la dosis mínima de LPS que activa el total de las células B resulta en un aumento significativo de la migración en respuesta a gradientes de CXCL13 y CCL21, así como en aumentos significativos en adhesión, polarización, migración y direccionalidad de las células B en respuesta a CXCL13 en sustratos bidimensionales.

4. Los efectos mediados por la estimulación de TLR4 a 4 h en el comportamiento de las células B son dependientes de la ruta de señalización de MyD88; la ruta de señalización de TRIF tiene un papel menor.

5. La activación de las MAPK ERK1/2 y p38 por la estimulación de TLR4 no es necesaria para los efectos de LPS a tiempos cortos de exposición (4 h) sobre el comportamiento de las células B. La exposición a LPS sí promueve una mayor activación de ERK1/2 por CXCL13/CXCR5, sin cambios en p38.

6. La estimulación por TLR4 no cambia los niveles ni la activación basal o en respuesta a CXCL13 de la GTPasa RhoA en células B, mientras que sí disminuye los niveles de NM-II activa.

7. Los niveles de la GTPasa Cdc42 y su actividad basal o en respuesta a CXCL13 no resultan afectados por la exposición a LPS durante 4 h. WASP/WIP sí están implicados en el aumento de migración en respuesta a gradientes de quimioquina de células B mediado por TLR4, pero no en los cambios en el movimiento dependiente de adhesión.

8. La exposición de células B a LPS causa un aumento en la actividad basal de la GTPasa Rac, así como una mayor y perdurable activación de Rac en respuesta a CXCL13. La mayor actividad de Rac promueve la polimerización de actina en las células B y, posiblemente, el aumento en polarización. El aumento en los niveles de PAK1 y ERM activas puede estar implicado en los efectos de TLR4 sobre el comportamiento de las células B.

BIBLIOGRAFIA

A

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.

Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., and Miyake, K. (2000). Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 164, 3471-3475.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5, 943-952.

Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20, 149-157.

Anton, I.M., de la Fuente, M.A., Sims, T.N., Freeman, S., Ramesh, N., Hartwig, J.H., Dustin, M.L., and Geha, R.S. (2002). WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity* 16, 193-204.

Ashwell, J.D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 532-540.

B

Bai, Z., Hayasaka, H., Kobayashi, M., Li, W., Guo, Z., Jang, M.H., Kondo, A., Choi, B.I., Iwakura, Y., and Miyasaka, M. (2009). CXC chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naive T cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J Immunol* 182, 1287-1295.

Bajenoff, M., Egen, J.G., Koo, L.Y., Laugier, J.P., Brau, F., Glaichenhaus, N., and Germain, R.N. (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 25, 989-1001.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bañón-Rodríguez I, S.d.G.J., Bernardini A, Ragazzini C, Fernández E, Carrasco YR, Jones GE, Wandosell F, Antón IM. (2013). WIP regulates persistence of cell migration and ruffle formation in both mesenchymal and amoeboid modes of motility. . PLOS One (in press).

Bardi, G., Niggli, V., and Loetscher, P. (2003). Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett* 542, 79-83.

Barr, T.A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J., and Gray, D. (2007). TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol* 37, 3040-3053.

Belkina, N.V., Liu, Y., Hao, J.J., Karasuyama, H., and Shaw, S. (2009). LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4707-4712.

Boes, M., Cerny, J., Massol, R., Op den Brouw, M., Kirchhausen, T., Chen, J., and Ploegh, H.L. (2002). T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 418, 983-988.

Brown, M.J., Nijhara, R., Hallam, J.A., Gignac, M., Yamada, K.M., Erlandsen, S.L., Delon, J., Kruhlak, M., and Shaw, S. (2003). Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood* 102, 3890-3899.

C

Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2006). B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *Embo J* 25, 889-899.

Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160-171.

Carrasco, Y.R., Fleire, S.J., Cameron, T., Dustin, M.L., and Batista, F.D. (2004). LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity* 20, 589-599.

Castellano, F., Montcourrier, P., Guillemot, J.C., Gouin, E., Machesky, L., Cossart, P., and Chavrier, P. (1999). Inducible recruitment of Cdc42 or WASP to a cell-surface receptor triggers actin polymerization and filopodium formation. *Curr Biol* 9, 351-360.

Chan, T.D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., and Brink, R. (2009). Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J Immunol* 183, 3139-3149.

Chen, Y., Wermeling, F., Sundqvist, J., Jonsson, A.B., Tryggvason, K., Pikkarainen, T., and Karlsson, M.C. (2010). A regulatory role for macrophage class A scavenger receptors in TLR4-mediated LPS responses. *Eur J Immunol* 40, 1451-1460.

Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Jr., and Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9, 54-62.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13, 759-769.

D

de la Fuente, M.A., Sasahara, Y., Calamito, M., Anton, I.M., Elkhail, A., Gallego, M.D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H.D., Anderson, K.C., et al. (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 926-931.

DeGrendele, H.C., Estess, P., Picker, L.J., and Siegelman, M.H. (1996). CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* 183, 1119-1130.

del Pozo, M.A., Cabanas, C., Montoya, M.C., Ager, A., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F. (1997). ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol* 137, 493-508.

del Pozo, M.A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J.M., and Sanchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29, 3609-3620.

Delorme-Walker, V.D., Peterson, J.R., Chernoff, J., Waterman, C.M., Danuser, G., DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2011). Pak1 regulates focal adhesion strength, myosin IIA distribution, and actin dynamics to optimize cell migration. *J Cell Biol* 193, 1289-1303.

Divanovic, S., Trompette, A., Petiniot, L.K., Allen, J.L., Flick, L.M., Belkaid, Y., Madan, R., Haky, J.J., and Karp, C.L. (2007). Regulation of TLR4 signaling and the host interface with pathogens and danger: the role of RP105. *J Leukoc Biol* 82, 265-271.

E

Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229, 152-172.

Erickson, L.D., Foy, T.M., and Waldschmidt, T.J. (2001). Murine B1 B cells require IL-5 for optimal T cell-dependent activation. *J Immunol* 166, 1531-1539.

Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* 117, 1291-1300.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 67-72.

F

Faroudi, M., Hons, M., Zachacz, A., Dumont, C., Lyck, R., Stein, J.V., and Tybulewicz, V.L. (2010). Critical roles for Rac GTPases in T-cell migration to and within lymph nodes. *Blood* 116, 5536-5547.

Faure-Andre, G., Vargas, P., Yuseff, M.I., Heuze, M., Diaz, J., Lankar, D., Steri, V., Manry, J., Hugues, S., Vascotto, F., et al. (2008). Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science* 322, 1705-1710.

Fleire, S.J., Goldman, J.P., Carrasco, Y.R., Weber, M., Bray, D., and Batista, F.D. (2006). B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* 312, 738-741.

Friedman, H. (1983). Immunomodulation by small molecular weight bacterial products. *Adv Exp Med Biol* 166, 199-214.

Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., and Sasazuki, T. (2001). Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* 412, 826-831.

G

Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273, 23169-23175.

Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol* 178, 7779-7786.

Giagulli, C., Scarpini, E., Ottoboni, L., Narumiya, S., Butcher, E.C., Constantin, G., and Laudanna, C. (2004). RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. *Immunity* 20, 25-35.

Gonzalez-Amaro, R., Diaz-Gonzalez, F., and Sanchez-Madrid, F. (1998). Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* 56, 977-988.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

Gray, D., Dullforce, P., and Jainandunsing, S. (1994). Memory B cell development but not germinal center formation is impaired by in vivo blockade of CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 180, 141-155.

Gu, Y., Filippi, M.D., Cancelas, J.A., Siefiring, J.E., Williams, E.P., Jasti, A.C., Harris, C.E., Lee, A.W., Prabhakar, R., Atkinson, S.J., et al. (2003). Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 302, 445-449.

Gururajan, M., Jacob, J., and Pulendran, B. (2007). Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PLoS One* 2, e863.

H

Ha, S.A., Tsuji, M., Suzuki, K., Meek, B., Yasuda, N., Kaisho, T., and Fagarasan, S. (2006). Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J Exp Med* 203, 2541-2550.

Hao, J.J., Liu, Y., Kruhlak, M., Debell, K.E., Rellahan, B.L., and Shaw, S. (2009). Phospholipase C-mediated hydrolysis of PIP2 releases ERM proteins from lymphocyte membrane. *J Cell Biol* 184, 451-462.

Hayashi, F., Means, T.K., and Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660-2669.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.

Hertz, C.J., Kiertcher, S.M., Godowski, P.J., Bouis, D.A., Norgard, M.V., Roth, M.D., and Modlin, R.L. (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166, 2444-2450.

Heuertz, R.M., Tricomi, S.M., Ezekiel, U.R., and Webster, R.O. (1999). C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement. *J Biol Chem* 274, 17968-17974.

Heuze, M.L., Collin, O., Terriac, E., Lennon-Dumenil, A.M., and Piel, M. (2011). Cell migration in confinement: a micro-channel-based assay. *Methods Mol Biol* 769, 415-434.

Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., et al. (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743-748.

Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M.D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117, 4619-4628.

Hwang, I.Y., Park, C., Harrison, K., and Kehrl, J.H. (2009). TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones. *J Exp Med* 206, 2641-2657.

I

Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Arces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F., and Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 6, 319-327.

Ishihara, D., Dovas, A., Park, H., Isaac, B.M., and Cox, D. (2012). The chemotactic defect in wiskott-Aldrich syndrome macrophages is due to the reduced persistence of directional protrusions. *PLoS One* 7, e30033.

Ittner, A., Block, H., Reichel, C.A., Varjosalo, M., Gehart, H., Sumara, G., Gstaiger, M., Krombach, F., Zarbock, A., and Ricci, R. (2012). Regulation of PTEN activity by p38delta-PKD1 signaling in neutrophils confers inflammatory responses in the lung. *J Exp Med* 209, 2229-2246.

Ivetic, A., and Ridley, A.J. (2004). Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112, 165-176.

Ivins, B.E., Welkos, S.L., Little, S.F., Crumrine, M.H., and Nelson, G.O. (1992). Immunization against anthrax with *Bacillus anthracis* protective antigen combined with adjuvants. *Infect Immun* 60, 662-668.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.

J

Jabara, H.H., McDonald, D.R., Janssen, E., Massaad, M.J., Ramesh, N., Borzutzky, A., Rauter, I., Benson, H., Schneider, L., Baxi, S., et al. (2012). DOCK8 functions as an adaptor that links TLR-MyD88 signaling to B cell activation. *Nat Immunol* 13, 612-620.

Jacobelli, J., Bennett, F.C., Pandurangi, P., Tooley, A.J., and Krummel, M.F. (2009). Myosin-IIA and ICAM-1 regulate the interchange between two distinct modes of T cell migration. *J Immunol* 182, 2041-2050.

Jacobelli, J., Chmura, S.A., Buxton, D.B., Davis, M.M., and Krummel, M.F. (2004). A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat Immunol* 5, 531-538.

Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

Jones, B.W., Means, T.K., Heldwein, K.A., Keen, M.A., Hill, P.J., Belisle, J.T., and Fenton, M.J. (2001). Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 69, 1036-1044.

K

Kantor, A.B., and Herzenberg, L.A. (1993). Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 11, 501-538.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.

Kong, L., and Ge, B.X. (2008). MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis. *Cell Res* 18, 745-755.

Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Marquez, R., and Cuenda, A. (2005). BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 280, 19472-19479.

L

Lalor, P.A., and Morahan, G. (1990). The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. *Eur J Immunol* 20, 485-492.

Lammermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R., and Sixt, M. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453, 51-55.

Laudanna, C., Campbell, J.J., and Butcher, E.C. (1996). Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 271, 981-983.

Lee, J.H., Katakai, T., Hara, T., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol* 167, 327-337.

Liu, X., Ma, B., Malik, A.B., Tang, H., Yang, T., Sun, B., Wang, G., Minshall, R.D., Li, Y., Zhao, Y., et al. (2012a). Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. *Nat Immunol* 13, 457-464.

Liu, Y., Belkina, N.V., Park, C., Nambiar, R., Loughhead, S.M., Patino-Lopez, G., Ben-Aissa, K., Hao, J.J., Kruhlak, M.J., Qi, H., et al. (2012b). Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood* 119, 445-453.

Liu, Y.J., Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y., and MacLennan, I.C. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 21, 2951-2962.

Ludford-Menting, M.J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E.T., Pedersen, N., Thomas, S.J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L.E., Waterhouse, N.J., et al. (2005). A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22, 737-748.

M

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Mendoza, M.C., Er, E.E., Zhang, W., Ballif, B.A., Elliott, H.L., Danuser, G., and Blenis, J. (2011). ERK-MAPK drives lamellipodia protrusion by activating the WAVE2 regulatory complex. *Mol Cell* 41, 661-671.

Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296, 1869-1873.

Minguet, S., Dopfer, E.P., Pollmer, C., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Reth, M., Huber, M., and Schamel, W.W. (2008). Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur J Immunol* 38, 2475-2487.

Mueller, S.N., Hosiawa-Meagher, K.A., Konieczny, B.T., Sullivan, B.M., Bachmann, M.F., Locksley, R.M., Ahmed, R., and Matloubian, M. (2007). Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science* 317, 670-674.

N

Naiki, Y., Michelsen, K.S., Schroder, N.W., Alsabeh, R., Slepken, A., Zhang, W., Chen, S., Wei, B., Bulut, Y., Wong, M.H., et al. (2005). MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *J Biol Chem* 280, 29242-29249.

Nemazee, D., Gavin, A., Hoebe, K., and Beutler, B. (2006). Immunology: Toll-like receptors and antibody responses. *Nature* 441, E4; discussion E4.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

Nolz, J.C., Gomez, T.S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Burkhardt, J.K., Freedman, B.D., and Billadeau, D.D. (2006). The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol* 16, 24-34.

O

Okada, T., and Cyster, J.G. (2006). B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr Opin Immunol* 18, 278-285.

Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol* 3, e150.

Okada, T., Ngo, V.N., Ekland, E.H., Forster, R., Lipp, M., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* 196, 65-75.

P

Parameswaran, N., Matsui, K., and Gupta, N. (2011). Conformational switching in ezrin regulates morphological and cytoskeletal changes required for B cell chemotaxis. *J Immunol* 186, 4088-4097.

Park, C., Hwang, I.Y., Sinha, R.K., Kamenyeva, O., Davis, M.D., and Kehrl, J.H. (2012). Lymph node B lymphocyte trafficking is constrained by anatomy and highly dependent upon chemoattractant desensitization. *Blood* 119, 978-989.

Pasare, C., and Medzhitov, R. (2005). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438, 364-368.

Pearce, G., Audzevich, T., and Jessberger, R. (2011). SYK regulates B-cell migration by phosphorylation of the F-actin interacting protein SWAP-70. *Blood* 117, 1574-1584.

Pegtel, D.M., Ellenbroek, S.I., Mertens, A.E., van der Kammen, R.A., de Rooij, J., and Collard, J.G. (2007). The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by

stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr Biol* 17, 1623-1634.

Pestonjamasp, K.N., Forster, C., Sun, C., Gardiner, E.M., Bohl, B., Weiner, O., Bokoch, G.M., and Glogauer, M. (2006). Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation during chemotaxis. *Blood* 108, 2814-2820.

Q

Qi, H., Denning, T.L., and Soong, L. (2003). Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun* 71, 3337-3342.

R

Real, E., Faure, S., Donnadieu, E., and Delon, J. (2007). Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. *J Immunol* 179, 5649-5652.

Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416, 94-99.

Reif, K., Okkenhaug, K., Sasaki, T., Penninger, J.M., Vanhaesebroeck, B., and Cyster, J.G. (2004). Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* 173, 2236-2240.

Reis e Sousa, C., and Germain, R.N. (1999). Analysis of adjuvant function by direct visualization of antigen presentation in vivo: endotoxin promotes accumulation of antigen-bearing dendritic cells in the T cell areas of lymphoid tissue. *J Immunol* 162, 6552-6561.

Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145, 1012-1022.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 661-671.

Risco, A., del Fresno, C., Mambol, A., Alsina-Beauchamp, D., MacKenzie, K.F., Yang, H.T., Barber, D.F., Morcelle, C., Arthur, J.S., Ley, S.C., et al. (2012). p38gamma and p38delta kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 11200-11205.

Roger, T., Froidevaux, C., Le Roy, D., Reymond, M.K., Chanson, A.L., Mauri, D., Burns, K., Riederer, B.M., Akira, S., and Calandra, T. (2009). Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2348-2352.

Rolink, A.G., Schaniel, C., Andersson, J., and Melchers, F. (2001). Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol* 13, 202-207.

Rubtsov, A.V., Swanson, C.L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R., and Torres, R.M. (2008). TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *J Immunol* 180, 3882-3888.

S

Sabio, G., Arthur, J.S., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N.A., and Cuenda, A. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J* 24, 1134-1145.

Saez de Guinoa, J., Barrio, L., Mellado, M., and Carrasco, Y.R. (2011). CXCL13/CXCR5 signaling enhances B-cell receptor-triggered B-cell activation by shaping cell dynamics. *Blood* 118, 1560-1569.

Sanchez-Madrid, F., and del Pozo, M.A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18, 501-511.

Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M., and de Lanerolle, P. (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283, 2083-2085.

Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 1087-1095.

Serrador, J.M., Urzainqui, A., Alonso-Lebrero, J.L., Cabrero, J.R., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M., Yanez-Mo, M., and Sanchez-Madrid, F. (2002). A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes. *Eur J Immunol* 32, 1560-1566.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-1782.

Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M.E., Ng, L.G., MacKay, F., Rao, S.P., Kalled, S.L., and Scott, M.L. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol* 173, 2331-2341.

Smith, S.D., Jaffer, Z.M., Chernoff, J., and Ridley, A.J. (2008). PAK1-mediated activation of ERK1/2 regulates lamellipodial dynamics. *J Cell Sci* 121, 3729-3736.

Spaargaren, M., Beuling, E.A., Rurup, M.L., Meijer, H.P., Klok, M.D., Middendorp, S., Hendriks, R.W., and Pals, S.T. (2003). The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *J Exp Med* 198, 1539-1550.

Szczur, K., Xu, H., Atkinson, S., Zheng, Y., and Filippi, M.D. (2006). Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in neutrophils. *Blood* 108, 4205-4213.

T

Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S., and Takai, Y. (1997). Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272, 23371-23375.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.

Treanor, B., Depoil, D., Bruckbauer, A., and Batista, F.D. (2011). Dynamic cortical actin remodeling by ERM proteins controls BCR microcluster organization and integrity. *J Exp Med* 208, 1055-1068.

Troutman, T.D., Hu, W., Fulenchek, S., Yamazaki, T., Kurosaki, T., Bazan, J.F., and Pasare, C. (2012). Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 273-278.

U

V

Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., and Horwitz, A.R. (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118, 4917-4919.

Vlahakis, S.R., Villasis-Keever, A., Gomez, T., Vanegas, M., Vlahakis, N., and Paya, C.V. (2002). G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J Immunol* 169, 5546-5554.

von Bulow, G.U., van Deursen, J.M., and Bram, R.J. (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 14, 573-582.

Walmsley, M.J., Ooi, S.K., Reynolds, L.F., Smith, S.H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D.A., Cancro, M.P., and Tybulewicz, V.L. (2003). Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* 302, 459-462.

W

Weighardt, H., Kaiser-Moore, S., Vabulas, R.M., Kirschning, C.J., Wagner, H., and Holzmann, B. (2002). Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol* 169, 2823-2827.

West, M.A., Wallin, R.P., Matthews, S.P., Svensson, H.G., Zaru, R., Ljunggren, H.G., Prescott, A.R., and Watts, C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305, 1153-1157.

Westerberg, L., Greicius, G., Snapper, S.B., Aspenstrom, P., and Severinson, E. (2001). Cdc42, Rac1, and the Wiskott-Aldrich syndrome protein are involved in the cytoskeletal regulation of B lymphocytes. *Blood* 98, 1086-1094.

Westerberg, L., Larsson, M., Hardy, S.J., Fernandez, C., Thrasher, A.J., and Severinson, E. (2005). Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood* 105, 1144-1152.

White, R.G. (1976). The adjuvant effect of microbial products on the immune response. *Annu Rev Microbiol* 30, 579-600.

Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K.M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461, 104-108.

X

Y

Yonemura, S., Matsui, T., and Tsukita, S. (2002). Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* 115, 2569-2580.

Z

ANEXOS



ANEXO I. VIDEOS

Video 1. Comportamiento de las células B sobre membranas lipídicas que contienen ICAM-1 y CXCL13, en ausencia o presencia de bajas dosis de LPS. Imágenes de DIC e IRM de células B migrando sobre membranas que incluyen ICAM-1 (150 molec/ μm^2) y CXCL13, en ausencia (paneles superiores) o presencia (paneles inferiores) de LPS (0,25 $\mu\text{g/ml}$), a lo largo del tiempo (20 min; 4 imágenes/segundo). El desplazamiento de la célula se muestra en escala de color en función del tiempo.

Video 2. Comportamiento de las células B sobre membranas lipídicas que contienen ICAM-1 y CXCL13, en ausencia o presencia de LPS a dosis medias. Imágenes de DIC e IRM de células B migrando sobre membranas que incluyen ICAM-1 (150 molec/ μm^2) y CXCL13, en ausencia (paneles superiores) o presencia (paneles inferiores) de LPS (2,5 $\mu\text{g/ml}$), a lo largo del tiempo (20 min; 4 imágenes/segundo). El desplazamiento de la célula se muestra en escala de color en función del tiempo.

Video 3. Comportamiento de las células B sobre membranas lipídicas que contienen ICAM-1 y CXCL13, en ausencia o presencia de altas dosis de LPS. Imágenes de DIC e IRM de células B migrando sobre membranas que incluyen ICAM-1 (150 molec/ μm^2) y CXCL13, en ausencia (paneles superiores) o presencia (paneles inferiores) de LPS (25 $\mu\text{g/ml}$), a lo largo del tiempo (20 min; 4 imágenes/segundo). El desplazamiento de la célula se muestra en escala de color en función del tiempo.

Video 4. Dinámica de las células B no estimuladas o estimuladas con LPS durante 4 h. Las células B marcadas con sondas fluorescentes (CFSE, SNARF-1) se pusieron en cultivo en ausencia o presencia de LPS (2,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 4 h. A continuación, se mezclaron en ratio 1:1 y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 y CXCL13. Se muestran imágenes de DIC e IRM recogidas a lo largo del tiempo (20 min; 4 imágenes/segundo). Células rojas, no estimuladas; células verdes, estimuladas con LPS. El desplazamiento de las células se muestra en escala de color en función del tiempo.

Video 5. Dinámica de las células B no estimuladas o estimuladas con LPS durante 24 h. Células B marcadas con sondas fluorescentes (SNARF-1, CFSE) se dejaron en cultivo en ausencia o presencia de LPS (2,5 µg/ml) durante 24 h; posteriormente, se mezclaron en ratio 1:1 y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 y CXCL13. Se muestran imágenes de DIC e IRM recogidas a lo largo del tiempo (20 min; 4 imágenes/segundo). Células rojas, no estimuladas; células verdes, estimuladas con LPS; el desplazamiento de las células se muestra en escala de color en función del tiempo.

Video 6. Dinámica de las células B WT y MyD88^{-/-} tras 4 h de estimulación con LPS. Células B WT (rojas) y MyD88^{-/-} (verdes), previamente marcadas con sondas fluorescentes, se estimularon con LPS durante 4 h. A continuación, se mezclaron en ratio 1:1 y se depositaron sobre membranas en presencia de ICAM-1 y CXCL13. Se muestran imágenes de DIC e IRM recogidas a lo largo del tiempo (15 min; 4 imágenes/segundo). El desplazamiento de las células se muestra en escala de color en función del tiempo.

Video 7. Dinámica de las células B WT y TRIF^{-/-} tras 4 h de estimulación con LPS. Células B WT (rojas) y TRIF^{-/-} (verdes), previamente marcadas con sondas fluorescentes, se estimularon con LPS durante 4 h. Posteriormente se mezclaron en ratio 1:1, y se pusieron en contacto con membranas que contenían ICAM-1 y CXCL13. Se muestran las imágenes de DIC e IRM recogidas a lo largo del tiempo (15 min; 4 imágenes/segundo). El desplazamiento de las células se muestra en escala de color en función del tiempo.

ANEXO II. PUBLICACIONES

II.I Artículos científicos derivados directamente de la presente Tesis Doctoral

- **Barrio L.**, Sáez de Guinoa J., and Carrasco YR. TLR4 signaling shapes B cell dynamics via MyD88-dependent pathways and Rac GTPases. (2013) Journal of Immunology (in press).

- Risco A., **Barrio L.**, Escós A., Alsina-Beauchamp D., Barber DF., Carrasco YR. and Cuenda A. A role for p38g and p38d in lymphocyte development and B cell function. (2013) (submitted).

- Sáez de Guinoa J, **Barrio L.**, Mellado M. and Carrasco YR. CXCL13/CXCR5 signaling enhances B cell receptor-triggered B cell activation by shaping cell dynamics. (2011) Blood, Vol 118(6): 1560-1569.

II.II. Artículos científicos derivados de colaboraciones realizadas durante la realización de esta Tesis Doctoral.

- Sáez de Guinoa J, **Barrio L.**, and Carrasco YR. Vinculin arrests motile B cells by stabilizing integrin clustering at the immune synapse. (2013) Journal of Immunology, Vol 191 (5): .2742-2751.

- Robles EF., Mena-Varas M., **Barrio L.**, Macri-Pellizzeri L., Akasaka T., Parker A., Gardiner A., Agirre X., Vilas-Zornoza A., Aldaz B., Segura V., Martin-Guerrero I., Siebert R., Calasanz MJ., Tousseyn T., Cresson C., Broccardo C., Brousset P., Campos-Sanchez E., Cobaleda C., Grande L., Sanchez-Garcia I., Du M., Martinez-Anso E., Fernandez-Luna JL., Prosper F., Sagaert X., Oscier DG., Carrasco YR, Dyer MJS., and Martinez-Climent JA. Homeobox protein NKX2-3 modulates lymphocyte dynamics and promotes B cell lymphoma development. (2013) (submitted).

